А.А. Чиркин

БИОХИМИЯ С ОСНОВАМИ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Репозиторий ВГУ

2010

УДК 577.1(075)
ББК 28.072я73
Ч65

Автор: заведующий кафедрой химии УО «ВГУ им. П.М. Машерова», доктор биологических наук, профессор **А.А. Чиркин**

Р е ц е н з е н т ы:
заведующий кафедрой биохимии и биофизики Международного государственного экологического университета им. А.Д. Сахарова, кандидат биологических наук, доцент *С.Б. Бокуть*;
заведующий кафедрой генетики БГУ, доктор биологических наук, профессор *Н.П. Максимова*;
доцент кафедры биохимии БГУ, кандидат биологических наук, доцент *Н.М. Орел*

Изучение биохимии с основами генной инженерии является необходимым компонентом фундаментально ориентированной подготовки биоэкологов. Сочетание двух направлений исследований обосновывается тем, что изучение информационных, пластических и энергетических потоков в биосфере в рамках экологической биохимии дает основу для совершенствования различных живых систем в интересах человека методами генной инженерии. Учебное пособие построено в соответствии с действующим учебным планом специальности 1-33 01 01 «Биоэкология», специализации 1-33 01 01 01 «Общая экология». Оно включает 16 глав, из которых 11 глав посвящены вопросам экологической биохимии и 5 глав – вопросам генной инженерии. В учебном издании приведено 7 рисунков, 9 таблиц и 29 источников литературы. Предназначено для студентов, магистрантов и аспирантов биологических факультетов университетов и может использоваться также в практической деятельности биологами и биоэкологами.

УДК 577.1(075)
ББК 28.072я73

© Чиркин А.А., 2010
© УО «ВГУ им. П.М. Машерова», 2010

Репозиторий ВГУ

С О Д Е Р Ж А Н И Е

ВВЕДЕНИЕ ……. 6
ГЛАВА 1. **Введение в экологическую биохимию с основами генной инженерии** ……. 7
1.1. Определение дисциплины …… 7
1.2. Реакции биосистемы на действие повреждающих факторов …… 9
1.3. Особенности изучения реакций организма на повреждение …… 10
ГЛАВА 2. **Экологическая биохимия белков и ферментов** ……. 12
2.1. Рецепторы живого организма ……... 12
2.2. Взаимодействие ксенобиотиков с белками ……. 16
2.2.1. Усиление каталитической активности …….. 16
2.2.2. Ингибирование каталитической активности …….. 18
2.3. Ксенобиотики и белки крови …… 19
ГЛАВА 3. **Мембраны и ксенобиотики** ……... 21
3.1. Функции мембран …….. 21
3.2. Структура мембран ……... 21
3.2.1. Характеристика мембран …… 21
3.2.2. Липиды мембран …… 22
3.2.3. Мембрана является амфипатической структурой …… 22
3.2.4. Белки мембран …… 23
3.2.5. Углеводы мембран …… 24
3.2.6. Свойства мембран …… 24
3.3. Механизмы мембранного транспорта …… 25
3.3.1. Пассивный транспорт …… 25
3.3.2. Активный транспорт …… 26
3.3.3. Виды переноса веществ через мембраны …… 26
3.3.4. Транспорт макромолекул (везикулярный транспорт) …… 27
3.4. Действие ксенобиотиков на мембраны ……... 28
3.4.1. Прямое действие на мембраны …… 28
3.4.2. Активация окислительного стресса …… 29
3.4.3. Активация фосфолипаз и других ферментативных систем … 30
3.4.4. Биологические последствия действия ксенобиотиков на мембраны …… 32
3.5. Роль мембран в биологических барьерах …… 32
ГЛАВА 4. **Питание и сигнальные молекулы** ……... 35
4.1. Пищевые детерренты и антифиданты …… 35
4.2. Фазы извлечения энергии из питательных веществ и пищеварение 37
4.3. Гепатотоксичность …… 39
4.4. Запасание и распределение пищевых молекул ……... 40
ГЛАВА 5. **Ксенобиологический профиль среды и экологическая биохимия** ……... 42
5.1. Ксенобиологический профиль среды …….. 42
5.2. Роль эко(токсико)кинетики в экологической биохимии ……... 43
5.3. Эко(токсико)динамика …….. 44
5.4. Экотоксичность …… 45
5.5. Экологическая биохимия питания ……... 46
5.6. Проблемы экологической биохимии человека ……... 57

Репозиторий ВГУ

ГЛАВА 6. **Обезвреживание ксенобиотиков, микросомальное окисление, конъюгация** ……. 59
6.1. Роль печени в обезвреживании ксенобиотиков …….. 59
6.2. Метаболизм ксенобиотиков ……. 61
6.2.1. Первая фаза метаболизма ксенобиотиков …… 62
6.2.2. Реакции конъюгации метаболитов ксенобиотиков ……. 65
6.2.3. Элиминация ксенобиотиков ……. 67
6.3. Химическое повреждение печени …… 67
6.4. Ферменты кишечной микрофлоры …….. 68
6.5. Факторы, влияющие на метаболизм ксенобиотиков ……. 68
ГЛАВА 7. **Эколого-биохимические взаимодействия у прокариот, грибов и водорослей** …….. 71
7.1. Биохимическая экология прокариот в сопоставлении с эукариотами .. 71
7.2. Биохимические взаимодействия между грибами и водорослями (роль экзометаболитов) ……... 74
7.3. Эколого-биохимические взаимодействия между грибами и высшими растениями ……. 76
7.4. Взаимодействие грибов и водорослей с животными ……. 81
ГЛАВА 8. **Эколого-биохимические взаимодействия между высшими растениями, между растениями и животными** ……. 83
8.1. Эколого-биохимические взаимодействия между растениями …….. 83
8.2. Эколого-биохимические взаимодействия растений и животных …. 84
8.2.1. Биохимическая коэволюция растений и фитофагов …….. 85
8.2.2. Механизмы биохимического взаимодействия растений и животных ……. 88
8.3. Сигнальные молекулы, биохимия онтогенеза и плодовитости фитофагов ……. 88
8.3.1. Синтез растениями гормонов и ингибиторов линьки членистоногих .. 89
8.3.2. Хеморегуляторы растений и позвоночных животных …….. 91
ГЛАВА 9. **Эколого-биохимические взаимодействия между животными** 93
9.1. Внутривидовые взаимодействия …….. 93
9.1.1. Феромоны …….. 93
9.1.2. Феромоны беспозвоночных животных …… 94
9.1.3. Биосинтез феромонов …… 96
9.1.4. Практическое использование феромонов насекомых …….. 96
9.1.5. Феромоны и химическая сигнализация позвоночных …… 97
9.2. Взаимодействия между животными разных видов …… 99
9.2.1. Алломоны …….. 99
9.2.2. Кайромоны …… 100
ГЛАВА 10. **Биотрансформация экзогенных веществ в организмах и экосистемах** ……... 102
10.1. Антропогенные биологически активные вещества и загрязнение биосферы …….. 102
10.1.1. Структура пестицида и его функции …… 103
10.1.2. Пестициды и биосфера …….. 103
10.2. Биохимические аспекты формирования среды обитания и биотрансформации ксенобиотиков …….. 104
10.3. Филогенетические особенности метаболизма ксенобиотиков …... 107
10.4. Судьба ксенобиотиков в биогеоценозах ……... 108
10.5. Возможности экосистем к обезвреживанию ксенобиотиков …….. 110

Репозиторий ВГУ

ГЛАВА 11. **Экологическая биохимия и биогеоценозы** ……... 111
11.1. Как уменьшить загрязнение биосферы ……. 111
11.2. Экологически безопасные способы воздействия на виды, имеющие хозяйственное значение …….. 111
11.3. Биотестирование …….. 113
11.4. Закономерности эколого-биохимических взаимодействий в биосфере ……. 114
ГЛАВА 12. **Перенос генетической информации *in vivo*** …….. 117
12.1. Определения …… 117
12.2. Регуляция экспрессии генов у прокариот и эукариот *in vivo* …….. 122
12.3. Подвижные генетические элементы …….. 125
12.3.1. Транспозоны ……... 125
12.3.2. Плазмиды ……... 127
12.3.3. Фаги ……... 129
12.4. Перенос генов между видами …… 130
ГЛАВА 13. **Технология рекомбинантных ДНК** ……... 133
13.1. Рекомбинация …….. 136
13.2. Рестриктазы …….. 137
13.3. Полимеразы …….. 140
13.4. Векторы для клонирования в бактериях ……... 141
13.4.1. Плазмидные векторы ……... 143
13.4.2. Фаговые векторы ……... 145
13.5. Векторы для клонирования в эукариотических клетках …… 147
13.6. Геномная библиотека …….. 150
13.7. Направленный мутагенез …… 151
13.8. Экспрессия чужеродных генов …….. 152
ГЛАВА 14. **Генетическая инженерия и коммерческие продукты** …… 153
14.1. ДНК-диагностические тесты …….. 153
14.2. Производство белковых лекарств и вакцин …….. 155
14.3. Биодеградация токсических соединений …….. 156
14.4. Производство продуктов питания …… 157
ГЛАВА 15. **Трансгенные растения и животные. Программа «Геном человека»** ……... 159
15.1. Трансгенные растения …… 159
15.2. Трансгенные животные ……... 160
15.3. Программа «Геном человека» …… 163
ГЛАВА 16. **Патобиохимия клеток и биохимические механизмы адаптации** …….. 164
16.1. Молекулярные механизмы гибели клеток …… 164
16.2. Экологическая биохимия и опухолевый рост ……... 165
16.3. Экологическая биохимия и адаптация …….. 172
16.3.1. Типы адаптивных механизмов («стратегий») …… 173
16.3.2. Адаптация и метаболизм ……... 176
ЛИТЕРАТУРА …… 180

Репозиторий ВГУ

ВВЕДЕНИЕ

Изучение биохимии с основами генной инженерии является необходимым компонентом фундаментально-ориентированной подготовки биоэкологов. Пособие состоит из двух частей.

В *первой части* изложены материалы «экологических взаимодействий между организмами и их системами (популяциями и сообществами), опосредуемые химическими веществами, в основном теми, которые служат исключительно или прежде всего посредниками, передающими какую-то информацию, или регуляторами экологических процессов» (экологическая биохимия).

Среди молекул, хранящих информацию и реализующих ее в процессе матричных синтезов, уникальную роль играют нуклеиновые кислоты. Поэтому *во второй части* пособия относительно кратко изложены вопросы переноса генетической информации *in vivo* и *in vitro*. Использование эволюционно отобранных механизмов переноса генетической информации позволяет решать задачи направленной изменчивости прокариот и эукариотических организмов.

В предлагаемом учебном пособии сделана попытка скоординированного изложения фундаментальных и прикладных вопросов экологической биохимии, с одной стороны, и технологии рекомбинантных ДНК, с другой. В целом пособие предназначено для углубления представлений о взаимодействиях генотипа и фенотипа в экологии и формирования представлений о возможности искусственного совершенствования различных живых систем в интересах человека.

Учебное пособие построено в соответствии с действующим учебным планом специальности 1-33 01 01 «Биоэкология», специализации 1-33 01 01 01 «Общая экология». Учебное пособие включает 16 глав, из которых 11 глав посвящены вопросам экологической биохимии и 5 глав – вопросам генной инженерии, типам повреждения клеток и биохимическим механизмам адаптации. Учитывая потребности современной междисциплинарной терминологии, в учебном пособии введены понятия «сигнальные молекулы», «оксидативный стресс», «критерии обеспеченности организма питательными веществами», «опухолевая трансформация клеток» и др. Для эффективного поиска необходимого материала в учебном пособии приведено подробное оглавление, что позволило отказаться от предметного указателя. В учебном пособии приведено 7 рисунков, 9 таблиц. Крупный шрифт – материал для изучения, мелкий шрифт – материал для ознакомления.

Автор надеется, что предлагаемое учебное пособие займет свое место в системе образования студентов-биоэкологов. Все замечания и предложения будут с благодарностью приняты.

Репозиторий ВГУ

Г Л А В А 1. **ВВЕДЕНИЕ В ЭКОЛОГИЧЕСКУЮ БИОХИМИЮ С ОСНОВАМИ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

Наиболее важной проблемой постиндустриального общества является поддержание экологического равновесия в биосфере, изучение механизмов его нарушений с целью поиска адекватных защитных мероприятий. За последние десятилетия были открыты новые фундаментальные механизмы на молекулярном уровне, обеспечивающие взаимодействие различных живых организмов в экосистемах с участием широкого спектра сигнальных молекул. Эти исследования проводились на стыке экологии, биохимии и физиологии. Молекулы, хранящие и реализующие информацию, можно разделить на две группы: 1) нуклеиновые кислоты как хранилище генетической информации; 2) разнообразные сигнальные молекулы, передающие информацию внутри организма (например, гормоны) или между организмами (например, ферромоны) и обеспечивающие определенную биологическую реакцию.

Итак, в биосфере поддерживается равновесие благодаря управляемому сигнальными молекулами взаимодействию различных живых организмов. В то же время процессы эволюционного отбора и долговременной адаптации сопряжены с переносом генетической информации между живыми биологическими объектами [29]. Поэтому целесообразно изучать эти два глобальных процесса совместно в виде предмета «Экологическая биохимия с основами генной инженерии». Наблюдение за природной генной инженерией *in vivo* позволяет выявить биологические закономерности с тем, чтобы использовать их посредством технологии рекомбинантных ДНК *in vitro* [8].

1.1. Определение дисциплины

По мнению М.М. Телитченко и С.А. Остроумова (1990), многие экологически значимые сигнальные молекулы оказывают свое воздействие при участии ферментативных систем. Например, ряд веществ, синтезируемых растениями посредством ферментативных реакций, защищают их от патогенных грибов или фитофагов. Эволюционный отбор определенных ферментов позволил осуществлять детоксикацию вредных веществ, имеющихся у экологического партнера данного организма; таким путем идет коэволюционная адаптация грибов или насекомых к тем видам растений, которыми они питаются. Детоксикация и биодеградация загрязняющих веществ, как правило, осуществляется с участием в основном тех же биохимических механизмов, которые имелись у клеток для обезвреживания природных токсичных или чужеродных веществ. Химическое загрязнение экосистемы может нарушать химическую коммуникацию организмов с помощью сигнальных молекул. Исходя из вышеизложенного, *предметом*

Репозиторий ВГУ

изучения биохимической экологии «являются главным образом экологические взаимодействия между организмами и их системами (популяциями и сообществами), опосредуемые химическими веществами, в основном теми, которые служат исключительно или прежде всего посредниками, передающими какую-то информацию, или регуляторами экологических процессов. К предмету изучения биохимической экологии относятся также некоторые аспекты воздействия человека на биосферу, связанные с химическим загрязнением» [9]. Для дисциплины, которой посвящено данное учебное пособие, следует добавить в качестве *предмета* изучения механизмы переноса генетической информации между живыми объектами в природных условиях (*in vivo*) и их биотехнологическую реализацию *in vitro* методами генетической инженерии.

Объектами биохимической экологии с основами генной инженерии являются 1) «биохимически взаимодействующие организмы, популяции и сообщества организмов и конкретные вещества, которые опосредуют и регулируют широкий класс экологических взаимодействий (включая и трофические, и нетрофические взаимосвязи), а также биохимические реакции, в которых участвуют эти вещества»; 2) процессы передачи генетической информации между живыми организмами в природных и лабораторных условиях. При этом вещества и биохимические реакции рассматриваются как составные компоненты экологических систем и участники протекающих в биосфере экологических процессов. Заметим, что в классической биохимии исследуются энергетические и пластические процессы, в которых те же вещества могут изучаться как продукты внутриклеточного метаболизма без рассмотрения их экологического значения [9].

Методы биохимической экологии с основами генной инженерии включают в себя:

1) биологическое тестирование экологически значимых веществ;

2) методы физико-химического анализа, позволяющие разделить смеси веществ и охарактеризовать отдельные вещества;

3) методы анализа генома и протеома;

4) методы синтеза экологически значимых веществ с подтверждением их функциональной биологической значимости;

5) методы биоинформатики, компьютерного анализа и статистической обработки фактического материала.

Теоретическое значение предмета включает:

1) описание материальной основы экологического равновесия в биосфере;

2) сохранение этого равновесия;

3) поддержание биологического разнообразия живых организмов в экосистемах;

Репозиторий ВГУ

4) биохимическое противодействие неблагоприятным антропогенным и природным воздействиям на биосферу.

Практическое значение предмета заключается:

1) в повышении способности природных и антропогенных экосистем к самоочищению (создание микроорганизмов, способных разлагать поллютанты, повышение устойчивости к вредителям, окислительному стрессу и пр.);

2) в разработке и использовании в народном хозяйстве материалов, способных к деградации в окружающей среде после завершения срока использования;

3) в уменьшении химического загрязнения окружающей среды пестицидами, гербицидами и другими веществами благодаря разработке и внедрению альтернативных способов контроля популяций насекомых или сорняков;

4) в создании новых сортов растений, пород млекопитающих, птиц и рыб, обладающих улучшенными потребительскими свойствами и устойчивостью к различным неблагоприятным факторам физической, химической и биологической природы [9,21].

1.2. Реакции биосистемы на действие повреждающих факторов

Формирование и развитие реакций биосистемы на действие повреждающих факторов включает несколько этапов [7, 13]:

1. Повреждающий фактор (физической, химической или биологической природы) может оказывать обратимое или необратимое действие. Если последствия повреждения ведут к гибели живого организма, то такие повреждающие агенты изучает *токсикология*. В случае обратимых изменений, которые можно описать кинетическими уравнениями ферментативной активности (например, зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации ферментов, температуры, величины pH, концентрации и доступности субстрата реакции, действия конкурентных и неконкурентных ингибиторов и др.), механизмы и последствия повреждения следует изучать методологическими приемами и средствами экологической биохимии. В этом случае *характер биохимических реакций* на действие повреждающего фактора будет определяться количественной и качественной характеристиками повреждающего фактора, с одной стороны, и особенностями реактивности подверженного воздействию организма, с другой стороны.

2. На втором этапе следует оценить зависимости типа «характер воздействия–активность», «доза–эффект», «структура–активность» и др.

3. На третьем этапе исследуют биохимические реакции организма на воздействие: неспецифические стресс-реакции, реакции окислительного или восстановительного стресса, адекватность эволюционно отобран-

Репозиторий ВГУ

ных защитных структурно-биохимических механизмов (репаративный синтез ДНК, микросомальное окисление ксенобиотиков, конъюгация модифицированных ксенобиотиков, уровень антиоксидантной защиты, система иммунитета, свертывающая система крови и др.). На этом же этапе необходим анализ выраженности и степени обратимости структурных изменений (изучение процессов некроза и апоптоза клеток).

4. Три предшествующие этапа ведут к проявлению макроэффектов как на биохимическом уровне (движение, трансмембранный перенос веществ, биосинтезы первичных и вторичных метаболитов), так и на уровне организма, популяции, биогеоценоза и биосферы.

1.3. Особенности изучения реакций организма на повреждение

Проявления реакций организма определяются уровнем организации биологического объекта: клеточным, органным, организменным, популяционным [7].

1. Исследование взаимодействия экологического фактора с клеткой включает, прежде всего, оценку его *цитотоксичности*. Цитотоксичность оценивают с помощью:

– определения количества жизнеспособных клеток (окраска клеток кристалл-виолетом, МТТ-тест);

– установления механизма повреждения клетки (для выявления механизмов некроза изучают выход из клетки в окружающую среду фермента лактатдегидрогеназы, а для открытия механизмов апоптоза исследуют межнуклеосомные разрывы ДНК методом электрофореза и выявления картины «ДНК-лестница» или окрашивают ядра клеток специальными красителями типа Hoechst 33258);

– для оценки генотоксичности исследуют мутации. Наряду с классическими биологическими и морфологическими способами оценки мутационного процесса в настоящее время используют биочиповые технологии, а также арсенал методов изучения генома (полимеразная цепная реакция, геномная дактилоскопия, различные варианты определения последовательности нуклеотидов, повторяющихся элементов ДНК и др.).

2. Реакции на уровне отдельных органов или систем органов проявляются: болезнями химической этиологии (при хроническом действии ксенобиотиков); заболеваниями определенных органов и неопластическим процессом (малигнизацией клеток, снятием торможения с опухолевых стволовых клеток, неконтролируемым ростом опухолевых клеток, их распространением в соседние ткани или в отдаленные органы).

3. На уровне организма реакции проявляются состоянием *аллобиоза*, т.е. стойкими изменениями реактивности организма на воздействие физических, химических, биологических факторов окружающей среды, а также психических и физических нагрузок (аллергия, имму-

Репозиторий ВГУ

носупрессия, повышенная утомляемость и т.д.). Выделяют также специальные токсические реакции, которые развиваются у отдельных особей и, как правило, в особых условиях (действие дополнительных веществ, например, для опухолевой трансформации клеток недостаточно действие канцерогена, необходимо дополнительное хроническое влияние веществ-промоторов) и характеризуются длительным скрытым периодом (канцерогенез, эмбриотоксичность, нарушения репродуктивной функции и т.д.).

4. Повреждающие реакции на популяционном и биогеоценотическом уровнях часто обозначают как экотоксические. Экотоксический процесс на уровне человеческой популяции проявляется:

– ростом заболеваемости, смертности, числа врожденных дефектов развития, уменьшением рождаемости;

– нарушением демографических характеристик популяции (соотношение полов, возрастов и др.);

– падением средней продолжительности жизни членов популяции, их культурной деградацией.

1. Выявление реакций отдельных организмов популяции на молекулярном уровне позволяет обеспечить раннюю диагностику патологического действия экологических факторов.

В настоящее время для оценки фенотипа живого организма, а именно спектра белков, определяющих практически все реакции организма на внешние воздействия, используют методический аппарат *протеомики*. Так, широкое распространение получил метод двумерного электрофореза белков с хроматомасс-спектрометрическим детектированием. Такой метод исследования белков называют MALDI-TOF. Если удается получать ионы белков из раствора, то такой метод называется масс-спектрометрия-ESI (electrospray ionization, 1988 г.). Перспективным для экологической биохимии является масс-спектрометрия-SELDI (surface-enhanced laser desorption and ionization, 2001 г.). В данном варианте используют для ионизации лазерным импульсом белки, *сорбированные на различных поверхностях* (в зависимости от специфичности связывания исследуемого белка) – гидрофобной, анионной, катионной, содержащей ионы металлов, антитела, антигены, рецепторы, лиганды, ДНК и др.

Современные методы анализа позволяют достаточно быстро определить десятки тысяч веществ в биологических жидкостях. С помощью компьютерных технологий эти массивы данных обрабатываются и анализируются. Результатом такого анализа может быть открытие не только очевидных путей воздействия экологических факторов на организмы, но и минорных, зачастую скрытых, механизмов повреждения живых систем [13, 16, 20].

Репозиторий ВГУ

Г Л А В А 2. ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ БЕЛКОВ И ФЕРМЕНТОВ

Учитывая последовательность изучения разделов биохимии в процессе подготовки биоэколога, целесообразно придерживаться той же последовательности тем и при изучении экологической биохимии с основами генной инженерии.

Белки являются молекулами, которые определяют все функции организма. В рамках экологической биохимии следует рассмотреть 1) белки как мишени воздействия экологических факторов и 2) белки как реализаторы биологического действия экологических факторов.

Если рассматривать белки как мишени, то для экологической биохимии важны:

1) белки-рецепторы (белки-мишени) сигнальных молекул, через которые реализуются механизмы действия *эндогенных сигнальных молекул* (гормоны, простагландины, биогенные амины, янтарная кислота, продукты протеолиза и др.);

2) белки-рецепторы (белки-мишени) сигнальных молекул, через которые реализуются механизмы действия *экзогенных сигнальных молекул* (ферромоны, аттрактанты, стрессогенные молекулы раневого происхождения, восприятие света, звука и др.);

3) белки-рецепторы (белки-мишени) ксенобиотиков, через которые реализуются механизмы действия *экзогенных химических веществ-ксенобиотиков* (неорганические, органические и биологические токсины, экзогенные вещества природного и антропогенного происхождения) [13].

2.1. Рецепторы живого организма

Рецепторы служат для восприятия информации сигнальных молекул, частным случаем которых являются гормоны. Во внеклеточной жидкости гормоны присутствуют в очень низкой концентрации – в 10^6–10^9 раз ниже содержания других структурно сходных соединений (стеролов, аминокислот, пептидов, белков) и иных веществ, которые находятся в крови в концентрации 10^{-5}–10^{-3} моль/л. Следовательно, клетки-мишени должны отличать данный гормон (в общем случае – данную сигнальную молекулу) не только от других гормонов (других сигнальных молекул), присутствующих в малых количествах, но и от прочих соединений. Такую высокую избирательность обеспечивают рецепторы. Биологический эффект сигнальных молекул начинается с их связывания со специфическими рецепторами, а завершается, как правило, диссоциацией рецептора и сигнальной молекулы. В зависимости от физико-химических свойств сигнальной молекулы, опреде-

Репозиторий ВГУ

ляющих возможность ее переноса через мембраны, выделяют поверхностные (мембранные) и внутриклеточные рецепторы.

Свойства рецепторов:

1) по строению являются гликопротеинами;

2) обладают высоким сродством к гормону;

3) характеризуются высокой специфичностью связывания гормона;

4) отличаются насыщаемостью при физиологических концентрациях гормона (гиперболический закон связывания);

5) характеризуются обратимостью связывания (гормон и рецептор связываются за счет сил гидрофобного и электростатического взаимодействия);

6) обладают способностью к трансдукции сигнала.

Для непроникающих в клетку сигнальных молекул существуют три основных типа рецепторов:

1. *Рецепторы первого типа* являются белками, имеющими одну трансмембранную полипептидную цепь. Это аллостерические ферменты (тирозинкиназа, протеинфосфатаза, гуанилатциклаза), *активный центр которых расположен на внутренней стороне мембраны*. Внеклеточный домен этого рецептора связывается с сигнальной молекулой. Ферментативной активностью обладает внутриклеточный домен, который активируется, когда сигнальная молекула взаимодействует с внеклеточным доменом. К такому типу рецепторов принадлежат рецепторы инсулина, ростовых факторов и цитокинов.

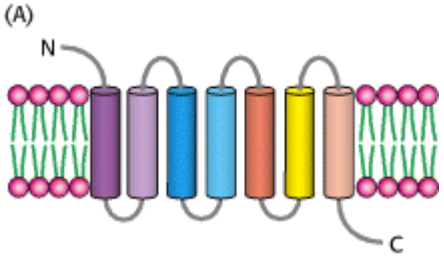
2. *Ионные каналы.* Эти рецепторы являются олигомерными белками, образующими лиганд-активируемый ионный канал. Эти каналы чаще всего находятся в закрытом состоянии и открываются на короткое время. Связывание лиганда ведет к открытию канала для ионов Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}. По такому механизму осуществляется действие нейромедиаторов, таких, как ацетилхолин и γ-аминомасляная кислота.

3. *Рецепторы третьего типа, сопряженные с ГТФ-связывающими белками (7ТМ-рецепторы).* Такие рецепторы передают сигнал с помощью G-белков на белки-эффекторы, которые являются ферментами или ионными каналами. В результате изменяется концентрация ионов или вторичных посредников (мессенджеров). Различают *Gs* (стимулирующий), *Gi* (ингибирующий) и *Gq*-белки. *Ферментами-эффекторами* являются аденилатциклаза, гуанилатциклаза, фосфолипаза С, цГМФ-фосфодиэстераза.

Наиболее распространенный тип мембранных рецепторов – это рецепторы, построенные из полипептидной цепи, 7 раз пересекающей мембрану (the seven-transmembrane-helix, 7TM) (рис. 2.1). Такие рецепторы участвуют в восприятии запаха, вкуса, зрительных образов, в нейротрансмиссии, секреции гормонов, хемотаксисе, экзоцитозе, контроле артериального давления, эмбриогенезе, росте и дифференциации клеток, развитии тканей и органов, в вирусных инфекциях и канцерогенезе. Из-

Репозиторий ВГУ

вестно несколько тысяч таких рецепторов. Наиболее изученным рецептором является родопсин, который воспринимает кванты света. Как правило, результатом взаимодействия сигнальной молекулы с 7ТМ-рецепторами является изменение *активности* регуляторных ферментов.



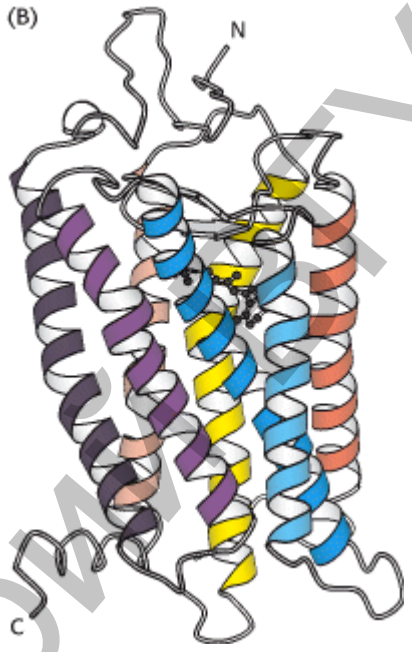


Рис. 2.1. **7ТМ-рецептор.**
А – полипептидная цепь рецептора семь раз пересекает мембрану. В – трехмерная структура родопсина, рецептора типа 7ТМ, принимающего участие в акте зрения (с рецептором связана воспринимающая фотон света молекула ретиналя) [16].

Сигнальные молекулы, проникающие в клетку (например, стероидные гормоны), после взаимодействия с внутриклеточными рецепторами оказывают влияние на экспрессию определенных генов, вызывая изменение *количества* белков-ферментов.

Такие представления о роли рецепторов существенно расширяются в рамках смежных с экологической биохимией разделов экологии и токсикологии. Например, взаимодействие ксенобиотика или продуктов его превращения со структурными элементами живых организмов, лежащее в основе экодинамики, называют механизмом действия ксенобиотика. Структурный компонент биологической системы, с которым вступает в химическое взаимодействие ксенобиотик, называют в данном случае также рецептором. Такие рецепторы – это участки относительно специфического связывания на биосубстрате ксенобиотиков (или эндогенных молекул), при условии, что процесс связывания подчиняется закону действующих масс. В качестве рецепторов могут выступать целые молекулы белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов, липидов или их фрагменты. В отношении фрагмента биомолекулы, которая непосредственно участвует в образовании комплекса с химическим веществом, часто используют термин – «рецепторная область». Например, рецептором оксида углерода в организме является молекула гемоглобина, а рецепторной областью – ион двухвалентного железа, заключенный в порфириновое кольцо гема. Биоэкологу целесообразно ознакомиться с расширенными представлениями о рецепторах [7,9]:

1. По мере эволюционного усложнения организмов формируются специальные молекулярные комплексы – элементы биологических систем, обладающие высоким сродством к отдельным химическим веществам, выполняющим функции биорегуляторов (гормоны, нейромедиаторы и др.). Участки биологических систем, обладающие наивысшим сродством к отдельным специальным биорегулято-

Репозиторий ГГУ

рам, получили название «селективные рецепторы». Вещества, взаимодействующие с селективными рецепторами в соответствии с законом действующих масс, называются лигандами селективных рецепторов. Взаимодействие эндогенных лигандов с селективными рецепторами имеет особое значение для поддержания гомеостаза. Многие селективные рецепторы состоят из нескольких субъединиц, из которых лишь часть имеет участки связывания лигандов. Нередко термин «рецептор» используют для обозначения только таких лиганд-связывающих субъединиц.

2. Постоянные рецепторы – это селективные рецепторы, строение и свойства которых кодируются с помощью специальных генов или постоянных генных комплексов. На уровне фенотипа изменение рецептора путем генной рекомбинации развивается чрезвычайно редко. Возникающие порой в ходе эволюции вследствие полигенетических трансформаций изменения аминокислотного состава белка, формирующего селективный рецептор, как правило, слабо сказываются на функциональных характеристиках последнего, его сродстве к эндогенным лигандам и ксенобиотикам. К числу постоянных рецепторов относятся:

– рецепторы нейромедиаторов и гормонов. Как и другие селективные рецепторы, эти рецепторы способны избирательно взаимодействовать и с некоторыми ксенобиотиками (лекарствами, токсинами, экзогенными сигнальными молекулами). Ксенобиотики могут при этом выступать как в качестве агонистов, так и антагонистов эндогенных лигандов. В итоге активируется или подавляется некая биологическая функция, находящаяся под контролем данного рецепторного аппарата;

– ферменты – белковые структуры, селективно взаимодействующие с субстратами, превращения которых они катализируют. Ферменты также могут взаимодействовать с чужеродными веществами, которые в этом случае становятся либо ингибиторами, либо аллостерическими регуляторами их активности;

– транспортные белки – избирательно связывают эндогенные лиганды определенного строения, осуществляя их депонирование или перенос через различные биологические барьеры. Токсиканты, взаимодействующие с транспортными белками, также выступают либо в качестве их ингибиторов, либо аллостерических регуляторов.

3. Рецепторы с изменяющейся структурой. В основном это антитела и антигенсвязывающие рецепторы Т-лимфоцитов. Рецепторы данного типа формируются в клетках-предшественниках зрелых клеточных форм вследствие индуцированной внешними воздействиями рекомбинации 2–5 генов, контролирующих их синтез. Если рекомбинация осуществилась в процессе дифференциации клеток, то в зрелых элементах будут синтезироваться рецепторы только определенного строения. Таким образом, формируются селективные рецепторы к конкретным лигандам, а пролиферация приводит к появлению целого клона клеток, содержащих эти рецепторы.

Рецепторы могут быть «немыми» и активными. «Немой» рецептор – структурный компонент биологической системы, взаимодействие которого с веществом не приводит к формированию ответной реакции (например, связывание мышьяка белками, входящими в состав волос, ногтей). Активный рецептор – структурный компонент биологической системы, взаимодействие которого с ксенобиотиком инициирует нарушения ферментативных химических реакций. В этом смысле часто используют термин «структура-мишень».

Принимаются постулаты:

– токсическое действие вещества выражено тем сильнее, чем большее количество активных рецепторов (структур-мишеней) вступило во взаимодействие с ксенобиотиком;

– токсичность вещества тем выше, чем меньшее его количество связывается с «немыми» рецепторами, чем эффективнее оно действует на активный рецептор (структуру-мишень).

Репозиторий ВГУ

Любая клетка, ткань, орган содержит огромное количество потенциальных рецепторов различных типов (инициирующих различные биологические реакции), с которыми могут вступить во взаимодействие лиганды. С учетом вышесказанного, связывание лиганда (как эндогенного вещества, так и ксенобиотика) на рецепторе данного типа является избирательным в определенном диапазоне концентраций. Увеличение концентрации лиганда в биосистеме приводит к расширению спектра типов рецепторов, с которыми он вступает во взаимодействие, а следовательно, изменению биологической активности.

Мишенями (рецепторами) для токсического воздействия могут быть [7]:

– структурные элементы межклеточного пространства;

– структурные элементы клеток организма;

– структурные элементы систем регуляции клеточной активности.

2.2. Взаимодействие ксенобиотиков с белками

Основные функции белков – транспортная, структурная, ферментативная – могут являться объектом действия ксенобиотиков. Нарушения свойств белков химическим веществом происходит различными путями, зависящими от структуры ксенобиотика, его концентрации и структурно-функциональных особенностей белка. При этом возможны: денатурация белка, блокада его активных центров, связывание активаторов и молекул, стабилизирующих белок и пр. К числу веществ, денатурирующих белки, относятся щелочи, кислоты, окислители, ионы тяжелых металлов. В основе денатурации лежит повреждение ковалентной дисульфидной и трех слабых взаимодействий (водородная связь, ионная связь, гидрофобное взаимодействие), стабилизирующих нативную структуру белков. Наиболее часто ксенобиотики взаимодействуют с карбоксильной, гидроксильной, аминной и сульфгидрильной группами радикалов аминокислот белков. Разнообразные ксенобиотики связывают сульфгидрильные группы – тиоловые яды (тяжелые металлы – ртуть, мышьяк, сурьма, таллий; органические соединения этих металлов – метилртуть, люизит). С карбоксильными группами взаимодействуют свинец, кадмий, никель, медь, марганец, кобальт.

Наиболее важным является взаимодействие ксенобиотиков с ферментами. При этом возможно:

– усиление каталитической активности (усиление синтеза ферментов, блокада разрушения ферментов, активация ферментов);

– угнетение каталитической активности (угнетение синтеза ферментов, ускорение разрушения ферментов, угнетение специфической активности.

Основную роль играют конформационные изменения молекул ферментов [7].

2.2.1. Усиление каталитической активности

1. Усиление синтеза ферментов может быть вызвано поступлением в организм *ксенобиотиков-индукторов*. Физиологическими индукторами синтеза ферментов являются многие субстраты и вещества,

Репозиторий ВГУ

повышающие содержание кофакторов в биосредах. Некоторые гормоны и их животные или растительные аналоги выступают в качестве индукторов синтеза белка. Так, например, действуют растительные фитоэстрогены. Несбалансированное питание животных культурами, содержащими фитоэстрогены в качестве вторичных метаболитов (люпин и др.) может оказать влияние на функционирование ферментов, связанных с репродуктивной функцией животных. Стероидные и тироидные гормоны – классические индукторы синтеза ферментов. Так, например, при стрессе избыточная продукция глюкокортикоидов приводит к протеолизу белков соединительной ткани и синтезу из образовавшихся аминокислот в печени глюкозы (глюконеогенез). Глюкокортикоиды являются индукторами синтеза фосфоенолпируваткарбоксикиназы, фруктозо-1,6-бисфосфатазы и глюкозо-6-фосфатазы. Гормоны щитовидной железы служат для метаморфоза, дифференцировки и правильного развития тканей организма путем индукции синтеза около 100 различных белков, включая ферменты.

2. Особое значение для экологической биохимии имеет явление *индукции ферментов, участвующих в метаболизме ксенобиотиков*. К числу индукторов таких ферментов относятся барбитураты, циклические углеводороды, полигалогенированные полициклические углеводороды и др. Токсичность 2,3,7,8-тетрахлордибензо-пара-диоксина (ТХДД, TCDD) связывают со способностью вызывать индукцию синтеза микросомальных ферментов. Многие индукторы, например, 3,4-бенз(а)пирен, 5-метилхолантрен, являются канцерогенами.

3. Активность сложных ферментов зависит *от наличия в биосредах кофакторов* (коферменты – производные витаминов, нуклеотидов и простетические группы – металлы). Поэтому при возрастных изменениях метаболизма рекомендуется введение сбалансированных витаминно-минеральных препаратов). Некоторые витамины действуют на обмен веществ подобно гормонам – жирорастворимые витамины D и A. Их введение необходимо для функционирования белков и ферментов, регулирующих обмен кальция или функционирования клеток протоков.

4. Ферменты, как и другие отработанные белки, часто метятся убиквитином и подвергаются разрушению протеолитическими ферментами. Активность последних может ингибироваться белками-*ингибиторами растительного или животного происхождения* (ингибитор трипсина из сои или трасилол, получаемый от земноводных). К ингибиторам разрушения ферментов относят некоторые химические вещества, например, карбамилфосфаты.

5. Разрушение SH-содержащих ферментов иногда начинается с их окисления, что ведет к образованию дисульфидных связей. Ксенобиотики с высоким *восстановительным потенциалом*, защищая сульфгидрильные группы, могут предотвращать разрушение ферментов.

Репозиторий ВГУ

6. Особую роль играют механизмы активации *лизосомальных ферментов*, вызывающих, при выходе в цитоплазму, аутолиз клеток. Это основа лизосомальных болезней; посредством такого механизма действуют на организм четыреххлористый углерод, дихлорэтан, иприты и другие (чаще гепатотоксичные) факторы [7].

2.2.2. Ингибирование каталитической активности

Снижение активности ферментов при действии ксенобиотиков является следствием трех эффектов: 1) подавления синтеза белковой части – апофермента и кофакторов; 2) активации разрушения фермента и 3) угнетения специфической активности.

1. К числу наиболее рапространенных кофакторов, помимо металлов, относятся железопорфирины, флавины, НАД, НАДФ, пиридоксальфосфат, тиаминпирофосфат и др. Отчасти эти вещества синтезируются в организме животных и человека, отчасти попадают с пищей в виде витаминов. Некоторые вещества являются *конкурентами кофакторов* ферментов. Так, дикумарол конкурентно препятствует утилизации печенью витамина К, необходимого для синтеза протромбина, поэтому через 24–96 ч после избыточного поступления вещества в организм возможно развитие кровотечений, угрожающих жизни. Некоторые органические ксенобиотики нарушают образование кофакторов из предшественников, поступающих с пищей. Так, гидразин и его производные, взаимодействуя с содержащимся в клетках пиридоксалем, образуют пиридоксальгидразоны, которые, в свою очередь, угнетают активность пиридоксалькиназы и тем самым блокируют синтез в организме пиридоксальфосфата. В итоге нарушаются процессы трансаминирования и декарбоксилирования аминокислот и функционирование гликогенфосфорилазы.

К числу полностью синтезируемых в организме кофакторов относятся железопорфирины. Блокада их синтеза приводит к тяжелым последствиям. Так, хроническое отравление свинцом сопровождается нарушением синтеза гема, вследствие чего развивается дефицит гемопротеинов (гемоглобина, миоглобина, гем-содержащих ферментов).

2. Процессы активации *разрушения ферментов* встречаются не так часто. Наиболее типичен этот процесс в жизненном цикле некоторых насекомых: гусеница – куколка – бабочка – грены – гусеница - … Катаболизм некоторых ферментов лимфоцитов, тимоцитов вызывается повышенными концентрациями глюкокортикоидов при хроническом стрессе.

3. *Ингибирование* ферментов может осуществляться по конкурентному, неконкурентному, бесконкурентному и смешанному типам.

– Конкурентное ингибирование возникает, когда ингибиторная молекула настолько похожа на истинный субстрат фермента, что последний их не различает. Например, эфиры холина (пропионилхолин,

Репозиторий ВГУ

бутирилхолин и др.) гидролизуются ацетилхолинэстеразой вместо ацетилхолина. Конкурентным ингибитором аконитазы ЦТК является фторлимонная кислота, образующаяся в процессе метаболических превращений фторуксусной кислоты. Некоторые ксенобиотики могут связываться с активным центром, фермент не повреждают, но сами не метаболизируются. Так действуют карбаматы – ингибиторы холинэстеразы. Аналогичный эффект оказывают фосфорорганические соединения, которые связываются ковалентно с активным центром холинэстеразы, препятствуя превращениям ацетилхолина. При конкурентном ингибировании Vmax не изменяется, а Km увеличивается.

– Неконкурентное ингибирование осуществляется, если ингибитор связывается с аллостерическим центром фермента, что ведет к изменению конформации всего фермента, включая область активного центра. В результате Vmax уменьшается, а Km не изменяется. Таким образом фторлимонная кислота угнетает активность транслоказы, фермента, обеспечивающего активный транспорт лимонной кислоты через мембраны митохондрий, а мышьяк и его соединения – SH-содержащие ферменты.

4. Прочие механизмы. Для осуществления ферментативной активности некоторые ферменты нуждаются в присутствии в среде ионов магния, кальция, калия, марганца, цинка, кобальта, селена и др. Связывание этих металлов ксенобиотиками приводит к уменьшению проявлений их биологической активности. Таков механизм токсического действия комплексообразователей (ЭДТА, ЭГТА и др.), салициловой кислоты и др. Особое значение имеют вещества, взаимодействующие с железом, кобальтом, медью, входящими в структуру более сложных простетических групп ферментов (гем-содержащих ферментов, цитохромов, каталазы, пероксидазы, гемоглобина, миоглобина). К таким ксенобиотикам относят цианиды, сульфиды, азиды, монооксид углерода и др. Некоторые ферменты контролируются системой восстановленного и окисленного глутатиона: это SH-содержащие ферменты, пирофосфатаза, фосфоглицеральдегид-дегидрогеназа, гемоглобин-редуктаза. Эти ферменты страдают при уменьшении концентрации восстановленного глутатиона гидроксиламином, фенилгидразином, дихлорэтаном [7, 13].

2.3. Ксенобиотики и белки крови

Рассмотрим судьбу ксенобиотиков в организме. Все вещества, включая ксенобиотики, проходят в организме ряд сходных этапов: поступление во внутреннюю среду, транспорт, распределение и метаболизм, выведение или накопление. Метаболическая судьба ксенобиотиков зависит от наличия ферментов, которые способны катализировать их превращения. При отсутствии таких ферментов ксенобиотики

Репозиторий ВГУ

обычно инертны и их судьба в организме будет описываться только процессами всасывания, транспорта и выделения. Ферменты, катализирующие превращения ксенобиотиков, не должны обладать высокой специфичностью по отношению к субстратам, поскольку эти субстраты относятся к категории чужеродных. По всей видимости, в процессе эволюции ферменты с высокой специфичностью стали основой собственного метаболизма живых организмов, а ферменты с низкой специфичностью к субстратам стали средством защиты путем инактивации чужеродных веществ. Таким образом, большинство ксенобиотиков подвергается ферментативным изменениям в организме (преимущественно в печени), но часть из них может выделяться в неизменном виде.

Важную роль в судьбе ксенобиотиков занимает их транспорт. Плазма крови человека содержит 65–75 г/л белка. Основная масса представлена альбуминами (35–55 г/л), являющимися неспецифическими транспортерами различных гидрофильных и гидрофобных веществ, включая ксенобиотики. Специфические транспортные белки находятся в области альфа- и бета-глобулинов. Взаимодействие этих белков с ксенобиотиками приводит к понижению концентрации свободно циркулирующих в плазме веществ, вследствие чего понижается количество ксенобиотиков, способных к проникновению в ткани. Липофильные вещества транспортируются в составе липопротеинов, а водорастворимые – преимущественно связываются с альбуминами и кислыми альфа$_1$-гликопротеинами. Потенциальными участками связывания ионизированных молекул ксенобиотиков белками являются остатки асп, глу, тир, цис, гис, лиз, арг, а также С- и N-концевые группы.

Альбумины плазмы крови человека хорошо растворимы в воде. Их молекулярная масса – 66000 Да. Они состоят из 585 аминокислотных остатков. Третичная структура стабилизируется 17 дисульфидными связями. При pH 7,4 альбумины находятся в форме анионов. Выделяют 6 основных центров связывания ксенобиотиков на молекуле альбумина. Физиологическая функция альбуминов состоит в связывании свободных жирных кислот и билирубина, циркулирующих в крови.

Если в растворе белка находится несколько химических соединений, между ними могут возникнуть конкурентные отношения за образование связи с белком. Например, при увеличении концентрации барбитурата, количество сульфаниламидного препарата, связывающегося с альбуминами, уменьшается. С другой стороны, галотан повышает способность альбумина связывать целый ряд разнообразных химических веществ. Такие изменения, вероятно, определяются конформационными сдвигами в белках.

Изменение характера и степени связывания ксенобиотиков и эндогенных липофильных молекул во многом определяет действие ксенобиотиков на клетки и органы-мишени [7].

Репозиторий ВГУ

Г Л А ВА 3. **МЕМБРАНЫ И КСЕНОБИОТИКИ**

Содержимое клетки отграничено от окружающей среды плазматической мембраной. Благодаря этому поддерживаются условия, позволяющие структурным элементам клетки выполнять присущие им функции. С другой стороны, через плазматическую мембрану осуществляется непрерывный транспорт различных молекул. Большая площадь контакта с окружающей средой (например, плазматическая мембрана печеночной клетки имеет площадь около 8000 мкм^2) полностью обеспечивает необходимый обмен веществ.

Мембраны – это высокоорганизованные структуры, построенные из белков и липидов и отграничивающие внутреннее пространство клетки или ее отсеков.

3.1. Функции мембран

1. Отделяют клетки от окружающей среды. Обладают избирательной проницаемостью, содержат специфические транспортные системы. Внутренние мембраны клеток ограничивают органеллы и формируют обособленные внутриклеточные отсеки – компартменты. Они обеспечивают функциональную специализацию клетки.

2. Мембраны играют центральную роль в системе межклеточных взаимодействий. В них располагаются рецепторы, воспринимающие химические, физические и другие внешние сигналы. Некоторые мембраны сами способны генерировать сигнал (химический или электрический).

3. Мембраны участвуют в процессах превращения энергии (фотосинтез, окислительное фосфорилирование).

3.2. Структура мембран

3.2.1. Характеристика мембран

Все биологические мембраны имеют общие признаки строения.

1. Мембраны являются *сложными структурами, построенными из липидов, белков и углеводов.* Основу мембран составляет липидный бислой, имеющий толщину 6–10 нм.

2. Соотношение белков и липидов в мембранах варьирует от *1:4* до *4:1* и зависит от типа клеток и органелл.

3. Мембраны являются *асимметричной* структурой с наружной и внутренней поверхностями.

4. Мембрана стабилизируется *нековалентными* связями и является *термодинамически стабильной* и *метаболически активной*.

5. Специфические белки встроены в мембраны и выполняют основные *функции* рецепции управляющих сигналов, межклеточного взаимодействия, транспорта веществ и пр.

Репозиторий ВГУ

6. Мембраны – это жидкостные структуры.

7. Большинство мембран способно к поляризации (для внутренней поверхности мембран типично значение потенциала -60 мВ). Мембраны играют ключевую роль в транспорте, преобразовании энергии и хранении энергии.

3.2.2. Липиды мембран

Основными липидами мембран являются *фосфолипиды, гликолипиды и холестерол.*

1. В мембранах присутствуют 2 основных класса *фосфолипидов*:

1.1. *Глицерофосфоглицериды* являются основным компонентом большинства мембран и состоят из спирта *глицерола*, 2-х остатков *жирных кислот*, остатка *фосфорной кислоты* и *спирта*: холина (фосфатидилхолин), этаноламина (фосфатидилэтаноламин), серина (фосфатидилсерин), глицерола (фосфатидилглицерол), глицеролфосфата, треонина или инозитола.

1.2. *Сфингомиелины* содержат спирт *сфингозин*. Жирная кислота присоединяется амидной связью к аминогруппе сфингозина. Первичная гидроксильная группа сфингозина эстерифицируется фосфорилхолином. Сфингомиелины находятся преимущественно в миелиновых оболочках.

1.3. *Гликолипиды* являются сахаросодержащими липидами и делятся на *ганглиозиды* и *цереброзиды*. *Цереброзиды* вместо фосфорилированного спирта содержат остаток гексозы (глюкозу или галактозу). *Ганглиозиды* содержат цепь из 3 и более остатков углеводов (например, сиаловые кислоты), которые присоединяются к первичной спиртовой группе сфингозина.

1.4. *Стероиды.* Основным стероидом в мембранах является *холестерол*, который находится преимущественно в плазматической мембране клеток. Молекула *холестерола* встраивается в фосфолипидный бислой, причем гидроксильная группа в положении 3 образует водородные связи с полярными головками фосфолипидов, а сочлененные кольца палочкообразной формы располагаются в гидрофобной зоне ацильных остатков фосфолипидов бислоя.

3.2.3. Мембрана является амфипатической структурой

1. Все молекулы липидов, входящих в состав мембран, имеют гидрофильную и гидрофобную области и поэтому являются *амфипатическими*.

2. Амфипатические липиды мембран имеют *полярную головку* и *неполярные гидрофобные хвосты*. Полярные головки нейтральны или имеют отрицательный заряд.

3. Насыщенные жирные кислоты имеют прямые хвосты, ненасыщенные жирные кислоты имеют цис-конформацию и изогнутые хвосты, что делает мембрану менее жесткой и более текучей.

Репозиторий ВГУ

4. Липиды формируют *бислой*, в котором гидрофобная область фосфолипидов защищена от воды, а гидрофильная область обращена к воде. Липидный бислой получают in vitro в виде липосом.

3.2.4. Белки мембран

По расположению белков в мембране, способу ассоциации с липидным бислоем их можно разделить на: поверхностные (периферические) мембранные белки, связанные с гидрофильной поверхностью липидного бислоя; интегральные мембранные белки, погруженные в гидрофобную область бислоя.

Прошивающие мембрану белки имеют конформацию α-спирали во внутренней части мембраны. В этой части белка преобладают гидрофобные аминокислотные остатки. Такая структура была впервые установлена при исследовании бактериородопсина (7 тесно упакованных α-спиралей, пересекающих мембрану размером 4,4 нм).

Поры или каналы в мембранах часто образуются β-структурами белков. Антипараллельные β-структуры связаны водородными связями и извиваясь формируют полый цилиндр, который выполняет функции поры. Важно, что остатки гидрофобных аминокислот взаимодействуют с гидрофобными группами внутримембранного окружения канала, а внутренняя поверхность канала образуется радикалами гидрофильных аминокислот.

Характеристика мембранных белков:

1. *Периферические* белки связаны с гидрофильной областью интегральных белков или с полярными головками липидного бислоя мембраны силами электростатического взаимодействия или водородными связями. Периферические белки могут быть выделены без разрушения мембраны концентрированными солевыми растворами или изменением pH. Многие рецепторы для гормонов являются периферическими белками.

2. *Интегральные* белки погружены в мембрану на определенную глубину или пронизывают мембрану насквозь (прошивающие). Такие белки могут быть экстрагированы только при разрушении мембраны органическими растворителями или детергентами.

Трансмембранные белки могут в виде нескольких α-спиралей или одиночной α-спирали пересекать мембрану. При этом большая (гидрофильная) часть такого белка экспонирована в воду. Некоторые белки могут проникать только на расстояние одного монослоя мембраны.

Интегральные белки, подобно липидам, обладают амфипатическими свойствами, и у них есть гидрофобные области, взаимодействующие с гидрофобными радикалами липидных молекул внутри бислоя, и гидрофильные, обращенные с обеих сторон мембраны к воде.

Если основные структурные особенности биологических мембран определяются свойствами их липидного бислоя, то специфические функции мембран – белками.

Репозиторий ВГУ

1. Мембранные белки можно разделить на две группы: *структурные* и *динамические белки*. Структурные белки поддерживают структуру всей мембраны. Это, как правило, периферические белки, выступающие в роли «молекулярного бандажа». Динамические белки непосредственно участвуют в процессах, происходящих на мембране. Выделяют три класса таких белков:

1) *транспортные* – участвующие в трансмембранном переносе веществ;

2) *каталитические* – это ферменты, интегрированные в мембрану и катализирующие происходящие там реакции;

3) *рецепторные* – это мембранные рецепторы, специфически связывающие такие соединения, как гормоны, нейромедиаторы, токсины, на наружной стороне мембраны, что служит сигналом для изменения метаболических процессов в мембране или внутри клетки.

3.2.5. Углеводы мембран

В составе мембран углеводы находятся только в соединении с белками (гликопротеины и протеогликаны) и липидами (гликолипиды). В мембране гликозилировано около 10% всех белков и 5–25% липидов. Углеводные цепи белков колеблются по составу от 2-членных структур до разветвленных 18-членных полисахаридов.

Функции углеводов:

1) определяют межклеточное взаимодействие;

2) участвуют в системе иммунитета (антигенные детерминанты групп крови);

3) входят в состав рецепторов.

3.2.6. Свойства мембран

Итак, подытожим основные свойства мембран:

1. *Текучесть (жидкостность) мембраны.* Текучесть мембраны характеризуется способностью компонентов мембраны к движению. Текучесть мембраны определяется липидным составом, процентом полиненасыщенных жирных кислот и холестерола.

2. *Избирательная проницаемость.* Это свойство обеспечивает регуляцию транспорта в клетку необходимых молекул, а также удаления из клетки продуктов метаболизма, т.е. активный обмен клетки и ее органелл с окружающей средой.

3. *Асимметричность мембраны.* По химическому составу наружная поверхность мембран отличается от внутренней. Мембраны асимметричны по липидному составу. Существует асимметрия расположения фосфолипидов в мембране. Фосфатидилхолин и сфингомиелины локализованы в наружном слое мембран, фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин – во внутреннем. Холестерол чаще находится в наружной части бислоя. Белки в мембранах расположены асимметрично (расположение периферических белков, различная степень по-

Репозиторий ВГУ

гружения интегральных белков). Наиболее асимметрично распределены в плазматической мембране гликолипиды и гликопротеины. Углеводные части гликолипидов и гликопротеинов выходят на наружную поверхность, иногда образуя сплошное покрытие на поверхности клетки – *гликокаликс*.

4. *Динамичность мембран.* Молекулы белков и липидов с высокой скоростью двигаются в плоскости мембраны (*латеральная диффузия*). Они легко меняются местами со своими соседями в пределах одного монослоя примерно 10 раз в секунду. Перемещение мембранных белков в латеральной плоскости может быть ограничено вследствие притяжения между функционально связанными белками и образования кластеров, что в конечном счете приводит к их мозаичному распределению в липидном слое.

Коэффициент диффузии липидов в разным мембранах примерно 1 мкм^2/с. Молекулы фосфолипидов могут перемещаться на расстояние 2 мкм в секунду. Следовательно, от одного конца бактерии к другому молекула фосфолипида перемещается за 1 секунду. Белки практически не диффундируют вдоль мембраны, например, коэффициент диффузии для весьма лабильного фоторецепторного белка родопсина не превышает 0,4 мкм^2/с, а для периферического мембранного белка фибронектина, взаимодействующего с внеклеточным матриксом, этот коэффициент меньше 10^{-4} мкм^2/с.

Кроме того, молекулы белков и липидов очень быстро вращаются вокруг своих продольных осей (*вращательная диффузия*).

Перескок липидных молекул из одного монослоя в другой (*поперечная диффузия*, flip-flop) осуществляется редко, а белки к такому перескоку вообще не способны. Причина исключительно медленного flip-flop заключается в его энергетической невыгодности, поскольку необходимо перенести полярную головку молекулы липида через гидрофобную область бислоя [13, 16–19, 27, 28].

3.3. Механизмы мембранного транспорта

Липидные бислои в значительной степени непроницаемы для подавляющего большинства веществ, и поэтому перенос через липидную фазу требует значительных энергетических затрат.

Различают пассивный транспорт (диффузию), активный транспорт и везикулярный транспорт.

3.3.1. Пассивный транспорт – это *перенос молекул по концентрационному или электрохимическому градиенту*, т.е. он определяется только разностью концентраций переносимого вещества на противоположных сторонах мембраны или направлением электрического поля и осуществляется без затраты энергии АТФ. Возможны два типа диффузии: простая и облегченная.

Репозиторий ВГУ

1. *Простая диффузия*. Происходит без участия мембранного белка. Скорость простой диффузии хорошо описывается обычными законами диффузии для веществ, растворимых в липидном бислое. Скорость движения молекулы определяется концентрационным градиентом и растворимостью молекулы в липидах. Транспорт воды через мембрану простой диффузией происходит очень медленно. В тканях, где необходим быстрый перенос воды (почки), вода диффундирует через специфические интегральные белки (аквапорины).

2. *Облегченная диффузия* – движение молекул по градиенту концентрации с использованием специфических мембранных белков-переносчиков. Следовательно, облегченная диффузия – это диффузионный процесс, сопряженный с взаимодействием транспортируемого вещества с белком-переносчиком. Этот процесс специфичен и протекает с более высокой скоростью, чем простая диффузия. Скорость переноса определяется концентрационным градиентом через мембрану и количеством молекул переносчика.

3.3.2. Активный транспорт – транспорт веществ против градиента концентрации (незаряженные частицы) или электрохимического градиента (для заряженных частиц), требующий затрат энергии.

Известны три основных типа первичного активного транспорта:

1) Натрий-калиевый насос – Na,K^+-аденозинтрифосфатаза (Na,K^+-АТФ-аза) переносит ионы натрия из клетки, а калия – в клетку.

2) Кальциевый насос – Ca^{2+}-АТФ-аза, который транспортирует Ca^{2+} из клетки или цитозоля в саркоплазматический ретикулум.

3) H^+-АТФ-аза – протонный насос, функционирующий в сопрягающих мембранах, в том числе в митохондриальной мембране.

При нарушении снабжения АТФ активный транспорт останавливается.

Выделяют два вида активного транспорта: 1) первичный активный транспорт использует энергию АТФ или окислительно-восстановительного потенциала; 2) при вторичном активном транспорте используют градиент ионов (H^+, K^+, Na^+ и др.), созданный на мембране за счет работы системы первичного активного транспорта.

3.3.3. Виды переноса веществ через мембраны

Согласованный перенос двух веществ называют котранспортом: при симпорте имеет место перенос обоих веществ в одном направлении, а при антипорте – в противоположных направлениях.

Унипорт – движение одного типа молекул в одном направлении. Наиболее простой вид переноса какого-либо растворенного вещества с одной стороны мембраны на другую, осуществляемый по механизму простой или облегченной диффузии.

Котранспорт – вид транспорта, при котором перенос одного вещества зависит от переноса другого. Осуществляется с помощью

Репозиторий ВГУ

транспортных белков, которые имеют центры связывания для переноса обоих веществ.

Симпорт – перенос вещества зависит от одновременного (или последовательного) переноса другого вещества в том же направлении.

Например, транспорт протонов и сахаров у бактерий, транспорт Na^+ и глюкозы у животных.

Антипорт – перенос одного вещества по градиенту концентрации приводит к перемещению другого вещества, присоединенного к этому переносчику с другой сторон мембраны, в противоположном направлении против градиента концентрации.

Ион-селективные каналы являются механизмом транспорта неорганических ионов через мембрану. Ионные каналы определяют проницаемость мембраны для специфических ионов и вместе с ионными насосами, такими, как Na^+,K^+-АТФ-аза, регулируют цитозольную концентрацию ионов и мембранный потенциал. Ионные каналы отличаются от ионных переносчиков по меньшей мере 3 признаками. Во-первых, скорость потока через каналы значительно выше, чем перенос с помощью переносчика – 10^7–10^8 ионов на канал в секунду, что близко к теоретическому максимуму скорости для неограниченной диффузии. Во-вторых, ионные каналы ненасыщаемы, их скорость не достигает максимума при высокой концентрации субстрата. В-третьих, они являются «воротами» – открывающимися или закрывающимися в ответ на некоторые внутриклеточные факторы [16, 19].

3.3.4. Транспорт макромолекул (везикулярный транспорт)

Крупные макромолекулы (белки, полисахариды и полинуклеотиды) или даже крупные частицы могут как поглощаться, так и секретироваться. При их переносе происходит последовательное образование и слияние окруженных мембраной пузырьков (везикул), т.е. перенос веществ вместе с частью плазматической мембраны.

Фагоцитоз (от греч. *фагос* – есть, *цитос* – клетка) наблюдается в специальных клетках (макрофагах и гранулоцитах). При фагоцитозе происходит захват крупных молекул (вирусы, бактерии, клетки). *Пиноцитоз* (от греч. *пинос* – пить) характерен для всех клеток. Происходит захват жидкости или растворенных компонентов. Пиноцитоз бывает неизбирательный и селективный рецепторно-опосредованный. При *эндоцитозе* поглощенное вещество окружается небольшим участком мембраны, который вначале впячивается, а затем отщепляется, образуя внутриклеточный пузырек, содержащий захваченный клеткой материал. Большинство частиц, поглощенных при эндоцитозе, попадает затем в лизосомы, где они подвергаются деградации.

Вещества, высвобождаемые путем экзоцитоза делят на 3 группы: 1) вещества, связывающиеся с клеточной поверхностью как периферические белки-антигены; 2) вещества, включающиеся во внекле-

Репозиторий ВГУ

точный матрикс – коллаген, гликозаминогликаны; 3) вещества, входящие во внеклеточную среду как сигнальные молекулы (инсулин, катехоламины, паратгормон) или ферменты (экзокринные железы, эктоферменты) [16,19].

3.4. Действие ксенобиотиков на мембраны

Ксенобиотики могут действовать на мембраны прямо или опосредованно. Наиболее вероятными механизмами опосредованного повреждения биологических мембран ксенобиотиками могут быть:

– активация перекисного (пероксидного) окисления липидов, т.е. окислительного стресса;

– активация фосфолипазной, кининазной, декарбоксилазной активностей клеток.

3.4.1. Прямое действие на мембраны

Ксенобиотики могут непосредственно взаимодействовать с белками и липидным бислоем мембран. Развивающиеся вследствие этого эффекты могут быть как неспецифичными (отсутствие строгой зависимости между структурой ксенобиотика и развивающимся эффектом), так и строго специфичными. Специфичность является следствием действия ксенобиотика на ферменты и белковые рецепторы. Часто действие ксенобиотика носит смешанный «полуспецифичный» характер.

В результате неспецифичного действия многочисленных ксенобиотиков (бензола, толуола, динитробензола, хлороформа, сапонинов, смачивающих веществ, тяжелых металлов и других денатурирующих агентов) может нарушаться структурная целостность мембран. Это приводит к деформации, лизису клетки и ее гибели. Например, при действии таких веществ развивается гемолиз эритроцитов.

Действуя в малых дозах на возбудимые мембраны нервных клеток ЦНС, органические растворители, спирты вызывают седативно-гипнотический эффект. В действии этих соединений, помимо неспецифических, прослеживаются и отчетливые специфические механизмы. Так, вещества со свойствами «неэлектролитов», накапливаясь в мембранах, одновременно изменяют их проницаемость для ионов Na^+, K^+, Ca^{2+}, Cl^-, что ведет к изменению процессов поляризации-деполяризации мембран.

Некоторые ксенобиотики избирательно действуют на мембраносвязанные ферменты, транспортные системы, рецепторные комплексы к сигнальным и биологически активным молекулам. К числу таких веществ относятся гликозиды, агонисты и антагонисты нейромедиаторов и гормонов, модификаторы ионных каналов и многие другие [7].

Репозиторий ВГУ

3.4.2. Активация окислительного стресса

Одной из основных причин патологических изменений в живых организмах является окислительный стресс. Мощными источниками оксидантов в организме животных и человека служат фагоцитирующие клетки крови, в первую очередь, сегментоядерные нейтрофилы. Основная функция нейтрофилов – уничтожение патогенных бактерий и грибов. Активированные нейтрофилы генерируют ферментативным образом продукты с высокой реакционной способностью с помощью НАДФН-оксидазы и миелопероксидазы (МПО). Данные редокс-ферменты активируются при стимуляции нейтрофилов бактериальными пептидами, белками острой фазы, некоторыми провоспалительными цитокинами, адгезивными молекулами, индукторами фагоцитоза. НАДФН-оксидаза и МПО последовательно формируют активированные формы кислорода и галогенов (АФКГ) ($O_2^{\cdot -}$, H_2O_2, $HO^{\cdot}$, HOCl, HOBr), способные окислять многие биологически важные молекулы.

Показано, что НАДФН-оксидаза, МПО и другие редокс-ферменты нейтрофилов играют отличающуюся роль при их вовлечении в различные патофизиологические реакции организма. НАДФН-оксидаза представляет собой мембраносвязанный комплекс, генерирующий $O_2^{\cdot -}$ у наружной поверхности клеток или внутри фаголизосом. МПО, депонированная в покоящихся клетках внутри азурофильных гранул, при активации нейтрофилов может высвобождаться внутрь фаголизосом и катализировать там окислительно-восстановительные реакции, а также способна секретироваться во внеклеточное пространство и вовлекаться в различные процессы даже без дальнейшего участия нейтрофилов. МПО проявляет высокую окислительную активность, что необходимо для внутриклеточного и внеклеточного уничтожения патогенных микроорганизмов при острой воспалительной реакции. В тоже время доказано, что секретированная во внеклеточное пространство МПО является причиной модификации биополимеров и липидов в плазме крови, эндотелии и других тканях организма и может способствовать развитию хронического воспаления, связанного с атеросклерозом, бронхиальной астмой, аллергическими дерматитами и другими заболеваниями. Повышение содержания МПО в плазме является прогностически неблагоприятным признаком при некоторых патологических процессах, например, уровень МПО в плазме коррелирует с риском инфаркта миокарда у людей.

Фосфолипиды клеточных мембран наиболее предрасположены к реакциям окисления, инициируемым свободными радикалами, образующимися в клетке. Этому способствует то обстоятельство, что молекулярный кислород в 7–8 раз лучше растворяется в липидной фазе, чем в воде и гидрофильных компартментах клетки. При химических воздействиях существенная активация процесса образования свобод-

Репозиторий ВГУ

ных радикалов (диффундирующих гидроксильных радикалов, супероксидного анион-радикала, пероксинитрита, а также продуктов миелопероксидазной реакции лейкоцитов – гипохлорной кислоты) приводит к усилению перекисного окисления липидов (ПОЛ) и повреждению биологических мембран. ПОЛ усиливается вторичным образованием из липидов гидроперекисей и других легко диффундирующих карбонильных радикалов, которые могут обусловливать неблагоприятные процессы, развивающиеся в клетках далеко за пределами места своего образования.

Для развития патологического процесса важно, чтобы окислительно-восстановительный цикл превращения ксенобиотика «работал» достаточно долго – до истощения механизмов антирадикальной защиты клетки. Поскольку непродолжительная инициация окислительно-восстановительного цикла трансформации ксенобиотика может стимулировать систему антиоксидантной защиты, при интоксикациях некоторыми прооксидантами возможно развитие парадоксальной реакции – угнетение процесса окисления липидов в тканях.

Для развития процесса важна степень насыщенности тканей кислородом. В полностью аэробной среде образующийся из ксенобиотика восстановленный метаболит подвергается быстрому обратному окислению. При этом значительно возрастает количество радикалов в виде вторичных активных форм кислорода. Поэтому хорошо снабжаемые кровью и насыщенные кислородом ткани (легкие, сердце, головной мозг) являются более чувствительными к повреждающему действию прооксидантов [7, 13, 15].

3.4.3. Активация фосфолипаз и других ферментативных систем

Важным механизмом повреждения биологических мембран является гидролиз фосфолипидов, наступающий вследствие активации фосфолипаз (особенно фосфолипазы С и A_2). Активация ферментов происходит в результате прямого или опосредованного (гипоксия, нарушение гомеостаза внутриклеточного кальция и др.) действия многих ксенобиотиков на клетки организма.

Рецепторы мембран через Gq белок могут быть связаны с ферментом плазматической мембраны фосфолипазой С, которая специфически катализирует гидролиз мембранного липида – фосфатидилинозитола 4,5-дифосфата. В результате образуется два вторичных посредника: инозитол 1,4,5-трифосфат (IP_3) и 1,2-диацилглицерол.

1. IP_3 является водорастворимой молекулой, поступает из мембраны в цитозоль к эндоплазматическому ретикулуму, связывается со специфическими рецепторами и способствует высвобождению Ca^{2+} из ЭПР. Концентрация Ca^{2+} повышается до 10^{-6} моль/л. Такая концентрация Ca^{2+} активирует протеинкиназу С.

Репозиторий ВГУ

2. Диацилглицерол, являясь относительно гидрофобной молекулой, латерально диффундирует в мембране и активирует протеинкиназу С, зависимую от концентрации ионов Ca^{2+}. Протеинкиназа С фосфорилирует специфические белки, изменяя их каталитическую активность.

Инактивация IP_3 осуществляется дефосфорилированием, диацилглицерола – гидролизом.

Результатом действия фосфолипазы A_2 на липиды биологических мембран является высвобождение арахидоновой кислоты. Последняя является источником биологически активных эйкозаноидов (рис. 3.1).

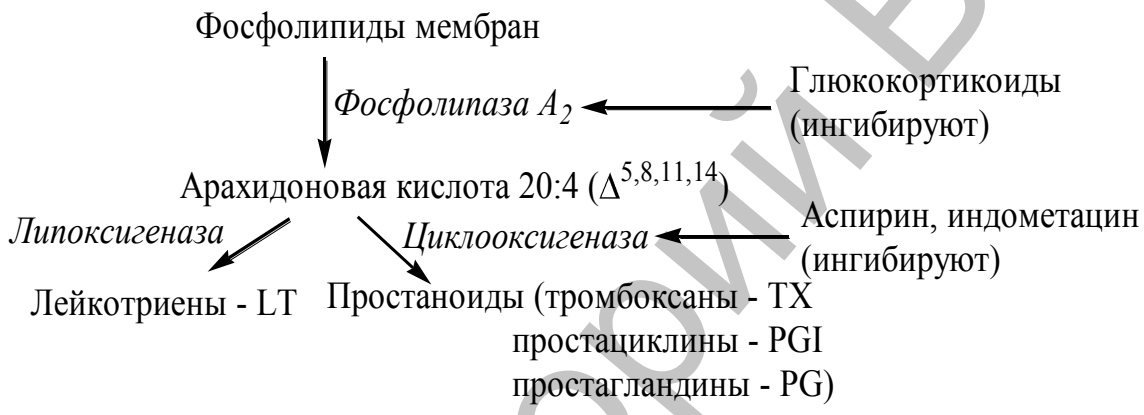


Рис. 3.1. **Синтез эйкозаноидов.**

В активации фосфолипазы A_2 принимают участие Ca^{2+}, тромбин, ангиотензин II, брадикинин, липопероксиды, адреналин.

Глюкокортикоиды тормозят активность фосфолипазы A_2, тем самым ингибируют синтез всех эйкозаноидов. Поэтому их применяют как противовоспалительные лекарства.

Арахидоновая кислота может вступать в *циклооксигеназный* и *липоксигеназный* пути превращения.

Простаноиды активируют воспалительные процессы в тканях, что может усиливать их повреждение. Лейкотриены – хемоаттрактанты для нейтрофилов; этот класс эйкозаноидов участвует в регуляции сосудистой проницаемости, а следовательно, в процессах генерализации действия ксенобиотиков.

Еще одним продуктом энзиматического расщепления липидов мембран является фактор агрегации тромбоцитов (ФАТ) – это семейство более 150 биологически активных веществ близкого строения. Они чрезвычайно токсичны. Например LD_{50} для кролика – 0,005 мг/кг, а для собаки – 0,07 мг/кг. При внутривенном введении развивается шокоподобное состояние.

Репозиторий ВГУ

В дерме кожи находятся клетки мастоциты (тучные клетки, лаброциты). Они весьма чувствительны к любым воздействиям, улавливаемым рецепторными полями кожи. В результате активируются специфичные декарбоксилазы, ведущие к образованию гистамина и серотонина и выбросу их в процессе дегрануляции клеток в межклеточное вещество. Гистамин является провоспалительным агентом: вызывает стаз и расширение капилляров, выход лейкоцитов из крови, фагоцитоз и/или реакции окислительного стресса. Тучные клетки элиминируют гистамин быстрее серотонина. Поэтому в острую фазу процесса отношение гистамин/серотонин высокое, а при выздоровлении – снижается [13, 16, 23, 25].

3.4.4. Биологические последствия действия ксенобиотиков на мембраны

Вещества, действующие на клеточные мембраны, как правило, изменяют следующие их параметры:

– проницаемость. Модифицируются поступление субстратов в клетки и отток продуктов метаболизма. Действие проявляется изменением интенсивности обмена веществ в клетке, нарушением электрических свойств мембран;

– электрический заряд. Нарушается раздражимость возбудимых клеток;

– структурная организация. Нарушается структура клеток. Возможно включение программы гибели клеток по механизмам некроза или апоптоза. Внешний путь включения механизмов запрограммированной гибели клеток (апоптоз) связан с функционированием рецепторов гибели клетки. Ранние морфологические признаки апоптоза иллюстрируются изменением мембран ядра, митохондрий и других субклеточных структур.

Поскольку система внутриклеточных мембран также является мишенью для действия многочисленных ксенобиотиков, среди них можно выделить группы 1) повреждающих работу цепей переноса электронов и сопряжения дыхания и фосфорилирования (митохондриальные яды); 2) повреждающих шероховатый эндоплазматический ретикулум (нарушения синтеза белков); 3) вызывающих нарушения мембран гладкого эндоплазматического ретикулума (индукция или угнетение метаболизма ксенобиотиков); 4) нарушения лизосомальных мембран (аутолиз клеток и др.) [7, 26].

3.5. Роль мембран в биологических барьерах

На пути вещества, диффундирующего в организме, постоянно встречаются барьеры – эпителиальные, эндотелиальные структуры; плазматические, ядерные, митохондриальные мембраны.

В биоэкологии возможно упрощенное понимание барьера как мембраны с определенным количеством пор и межклеточных промежутков (табл. 3.1, 3.2).

Репозиторий ВГУ

Таблица 3.1 – Характеристика различных биологических барьеров [7]

Тип барьера	Проницаемость для веществ	Примеры
Мембрана без пор	Хорошо растворимые в жирах, неионизированные молекулы	Слизистые полости рта, эпителий почечных канальцев, эпителий кожи, гематоэнцефалический барьер
Мембрана с порами малого размера (0,3–0,8 нм)	Хорошо растворимые в жирах и низкомолекулярные водорастворимые молекулы (до 200 Да)	Эпителий тонкой и толстой кишки
Мембрана с порами средних размеров (0,8–4 нм)	Липофильные и в меньшей степени гидрофильные молекулы	Слизистые оболочки глаз, носоглотки, мочевого пузыря
Мембрана с порами диаметром более 4–6 нм	Липофильные и гидрофильные молекулы с молекулярной массой до 1000 Да	Легкие, стенка капилляров кожи, мышц, желчные капилляры
Мембрана с порами большого диаметра	Липофильные и гидрофильные молекулы с большой молекулярной массой до 4000 Да	Печеночные капилляры
Пористая мембрана	Гидрофильные молекулы с молекулярной массой до 50000 Да	Гломерулярный аппарат почек

Определенный интерес представляет транспорт химических веществ через специальные каналы, называемые *коннексонами*. С их помощью возможен обмен между контактирующими друг с другом клетками веществами с молекулярной массой до 1000 Да (ионами, аминокислотами, сахарами, нуклеотидами). Коннексоны представляют собой белковые образования, состоящие из 6 субъединиц в каждой из контактирующих мембран. Диаметр поры коннексона в зависимости от концентрации Ca^{2+} в окружающей среде изменяется в интервале от 0 до 2 нм. Через коннексоны возможно проникновение в клетку ксенобиотиков. В настоящее время коннексоны обнаружены во всех тканях организма млекопитающих и человека, за исключением мышечной и нервной [7].

Репозиторий ВГУ

Таблица 3.2 – Механизмы проникновения химических веществ через биологические барьеры [7]

Прохождение через:	Механизмы	Вещества
Бислойные мембраны	Свободная диффузия в соответствии с градиентом концентрации	Жирорастворимые ксенобиотики
Ионные каналы («поры» 0,3–0,4 нм)	Затрудненная диффузия в соответствии с градиентом концентрации	Гидрофильные молекулы малых размеров; ионы, селективно проникающие через ионные каналы
Барьеры с помощью транспортных белков: пермеаз, транслоказ	Активный транспорт против градиента концентрации с потреблением АТФ; каталитическая диффузия	Некоторые субстраты, сахара, органические кислоты и основания
Барьеры путем инвагинации мембран	Фагоцитоз; пиноцитоз; эндоцитоз рецепторных молекул	Большие молекулы, частицы, капли диаметром до 20 нм
Межклеточные поры	Затрудненная диффузия, избирательная фильтрация	Ионы; большие молекулы нерастворимых в липидах веществ
Коннексоны	Контролируемая фильтрация	Ионы; аминокислоты; сахара; нуклеотиды (размеры до 2 нм)

Репозиторий ВГУ

Г Л А В А 4. **ПИТАНИЕ И СИГНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ**

Живые организмы являются открытыми системами. Они могут существовать, сохраняя энтропию на относительно постоянном уровне благодаря уравновешенности потоков пластического и энергетического материала: поступление–метаболизм–выведение. Пища является основным источником жизнедеятельности у гетеротрофных организмов. Рассмотрим факторы, обеспечивающие трофические цепи в экосистемах.

4.1. Пищевые детерренты и антифиданты

На образование трофических цепей в экосистемах и на поток энергии через них регулирующее, а иногда и определяющее воздействие оказывают:

1. Вторичные метаболиты растений, в частности, *гликозиды* (некоторые из них стали лекарствами – дигитоксин, олеандрин, β-строфантин, конваллатоксин и др.), являются факторами защиты растений от поедания. Некоторые гликозиды, относящиеся к сапонинам, токсичны для насекомых, моллюсков, рыб, амфибий. На содержание токсинов растений влияет длительность светового дня, что приводит к обратной зависимости между длительностью освещения растения и количеством личинок бабочек, кормящихся данным растением. Кроме вторичных метаболитов и белков вклад в резистентность растений к насекомым вносят токсичные для них полисахариды.

2. Экологические хеморегуляторы. К ним относятся *фагодетерренты* (пищевые детерренты и репелленты) и аттрактанты. Термины «фагодетеррент», или «пищевой детеррент» (лат. de – от; terrere – пугать), объединяют большой круг веществ: 1) вещества с токсичным действием, но иногда не настолько ядовитые, как классические растительные токсины; 2) вещества, снижающие питательную ценность корма, – танины, ингибиторы ферментов, особенно протеаз; 3) вещества, отпугивающие насекомых, вызывающие прекращение их питания, – пищевые репелленты.

Некоторые ученые определяют репелленты как вещества, заставляющие организм делать движения, ориентированные от источников этих веществ. К этой группе относят танины и алкалоиды. Танины – фенольные вещества с молекулярной массой от 500 до 3000 Да – один из биохимических барьеров, которые защищают растения от фитофагов. Они способны взаимодействовать с белками, что определяет их вяжущий вкус, отталкивающий позвоночных животных и насекомых.

Репозиторий ВГУ

Алкалоид демиссин обеспечивает устойчивость дикого картофеля к колорадскому жуку. Демиссин близок по структуре соланину – алкалоиду культивируемого картофеля. Однако соланин не действует на колорадского жука. Детеррентные свойства демиссину придают тетрасахаридная группировка, наличие ксилозы и отсутствие двойной связи в положении Δ5. В томате присутствует алкалоид томатин, который также имеет эти признаки демиссина, действует как репеллент на колорадского жука.

В реальных экосистемах при взаимодействии растения и фитофага детеррентный эффект может создаваться двумя и более веществами. Вторичные метаболиты с фагорепеллентными и антифидантными свойствами могли иметь большое значение для эволюции и выживания крупных таксонов растений. Это свойство использует человек. Например, у тропической травы *Curcumita longa* (сем. *Zingiberaceae*) найдены два нетоксичных для человека вещества – турмерон и артурмерон, но проявляющие репеллентное действие на насекомых, повреждающих зерна. На этом основана традиция в Индии и Пакистане хранить зерна риса и пшеницы с порошком указанного растения.

3. Пищевые аттрактанты и стимуляторы. Сюда относят вторичные метаболиты, которые принимают участие в формировании пищевых привязанностей. Для некоторых видов животных *аттрактантами* служат такие соединения, которые для большинства остальных видов токсичны или являются репеллентами, например кукурбитацин, алкалоид спартеин, едкое горчичное масло – аллилизотиоцианат. Во многих случаях при взаимодействии конкретных видов растения и животного-фитофага в качестве пищевого аттрактанта выступает несколько соединений. Так, в формировании привязанностей при питании некоторых видов чешуекрылых участвует не менее полутора десятков компонентов. Например, шелковичный червь *Bombyx mori* питается только листьями черной и белой шелковиц. Эту пищевую избирательность определяют три группы химических веществ, содержащихся в листьях: ольфакторные аттрактанты, байтинг-факторы и глотательные факторы. Ольфакторные аттрактанты привлекают личинок шелковичного червя на некотором расстоянии от листа. Если хирургически удалить оральные рецепторы насекомых, то они немедленно теряют способность различать пищу и начинают есть листья почти любых растений. Среди байтинг-факторов три вещества – сахароза, инозитол и ситостерол – могут быть пищевыми стимуляторами для многих насекомых. Два других соединения – морин и изокверцитрин – распространены не так широко: они вносят вклад в формирование специфичности. В молекулу изокверцитрина входит остаток глюкозы; при его замене на рамнозу этот аттрактант превращается в фа-

Репозиторий ВГУ

горепеллент. Глотательные вещества малоспецифичны и стимулируют акт глотания у насекомых.

Аллилизотиоцианат, который является острым, на вкус человека, компонентом горчицы, действует как пищевой репеллент для большинства животных.

На пищевое поведение влияют многие терпеноиды, флавоноиды, производные аминокислот и другие вещества.

Человечество издавна применяет специи для повышения привлекательности пищи. В последние годы показано, что специи обладают антиоксидантными свойствами. Поэтому их применение полезно не только для ароматизации пищевых продуктов, но и для защиты пищи от действия активных форм кислорода [9, 21].

4.2. Фазы извлечения энергии из питательных веществ и пищеварение

Освобождение энергии в живой клетке осуществляется постепенно, благодаря этому на различных этапах ее выделения она может аккумулироваться в удобной для клетки химической форме в виде АТФ.

Различают три фазы, которые совпадают со стадиями катаболизма.

Первая фаза – подготовительная. На этой стадии происходит распад полимеров до мономеров в желудочно-кишечном тракте или внутри клеток. Освобождается до 1% энергии субстратов, которая рассеивается в виде тепла.

Вторая фаза – распад полимеров до общих промежуточных продуктов. Для нее характерно частичное (до 20%) освобождение энергии, заключенной в исходных субстратах. Часть этой энергии аккумулируется в фосфатных связях АТФ, а часть рассеивается в виде тепла.

Третья фаза – распад веществ до CO_2 и H_2O с участием кислорода. Примерно 80% всей энергии химических связей веществ освобождается в данной фазе, которая сосредотачивается в фосфатных связях АТФ.

Биологическая ценность пищи определяется ее компонентами, не способными синтезироваться в организме. В питании человека 50% белков должны быть белками *животного происхождения*, так как в них содержатся незаменимые аминокислоты; 25% жиров должны быть растительными маслами, так как в них находятся *полиненасыщенные жирные кислоты* (линолевая, линоленовая), которые не синтезируются в организме; 30 г углеводов должно быть представлены клетчаткой, необходимой для перистальтики кишечника. Витамины сохраняют свою роль как внутриклеточные регуляторы метаболизма, но высшие животные и человек утратили способность к их биосинтезу в процессе эволюции. Например, для жизнедеятельности *E.coli* доста-

Репозиторий ВГУ

точно глюкозы и органических солей, а для человека необходимо, чтобы в пище содержалось как минимум 12 витаминов.

В настоящее время для коррекции структуры питания широко применяются биологически активные добавки к пище (БАД). *БАД* – это концентраты натуральных или идентичных натуральным биологически активных веществ, предназначенные для непосредственного приема или введения в состав пищевых продуктов. В соответствии с действующим законодательством, БАД относятся к пищевым продуктам, а не к лекарственным средствам. В Российской федерации выделяют три группы БАД:

1. *Нутрицевтики* – природные компоненты пищи, такие, как витамины или их близкие предшественники (например, β-каротины), полиненасыщенные жирные кислоты семейства ω(омега)-3, ω-6, некоторые моно- и дисахариды, пищевые волокна (целлюлоза, пектины) и др., предназначенные для коррекции химического состава пищи человека.

2. *Парафармацевтики* – это БАД, применяемые для профилактики, вспомогательной терапии и поддержки в физиологических границах функциональной активности органов и систем.

3. *Эубиотики (или пробиотики)* – это БАД, в состав которых входят живые микроорганизмы и (или) их метаболиты, оказывающие нормализующее воздействие на состав и биологическую активность микрофлоры пищеварительного тракта.

Всасывание продуктов пищеварения и компонентов пищи у человека в желудке незначительно (за исключением этанола). Более 90% продуктов переваривания всасывается в тонком кишечнике. Большая часть воды всасывается в толстом кишечнике. Существует *два пути поступления продуктов переваривания пищи во внутреннюю среду* организма: водорастворимые компоненты поступают в печеночную портальную вену и в печень; жирорастворимые вещества поступают в лимфатические сосуды и затем в кровь через грудной лимфатический проток. В дистальных отделах тонкого кишечника в области пейеровых бляшек возможно всасывание крупных молекул в лимфатические сосуды, окружающие скопления лимфоидных клеток.

Весь процесс переваривания пищи представляет собой последовательное ферментативное расщепление пищевых макромолекул. В процессе эволюции в желудочно-кишечном тракте образовались «полости» (ротовая полость, желудок, двенадцатиперстная кишка, тонкий кишечник), в которых при различных условиях происходит поэтапный гидролиз химических связей пищевых веществ. Каждая полость имеет специфический набор ферментов и систему регуляции процесса пищеварения.

В зависимости от расположения ферментов пищеварение у животных и человека может быть 3-х видов: *полостное* (гидролиз ферментами, находящимися в свободном виде), *мембранное*, или пристеночное (гидролиз ферментами, находящимися в составе мембран), и *внутриклеточное* (гидролиз ферментами, находящимися в органоидах клетки). Для пищеварительного тракта характерны полостное и мембранное пищеварение. Мембранное пищеварение происходит в ворсинках кишечника. При этом гидролиз небольших молекул (например, дипептидов и дисахаридов) происходит на поверхности клеточной мембраны кишечного эпителия и одновременно сочетается с транспортом продуктов гидролиза внутрь клетки. Внутриклеточный гидролиз осуществляется ферментами лизосом.

У животных и человека *регуляция пищеварения* осуществляется рефлекторно и с помощью биорегуляторов. На молекулярном уровне в регуляции участвуют гормоноподобные вещества, которые вырабатываются в одних отделах же-

Репозиторий ВГУ

лудочно-кишечного тракта, а действуют через кровь на другие. Выделение регуляторов происходит под действием пищи и определяется ее составом. Например, у человека при поступлении пищи в желудок клетками слизистой выделяется *гистамин* и *гастрин*, которые обеспечивают секрецию HCl и пепсиногена. Переход желудочного содержимого в двенадцатиперстную кишку служит сигналом к выделению *энтерогастрона*, который тормозит секрецию HCl и пепсиногена в желудке. Поступление кислого содержимого желудка в двенадцатиперстную кишку способствует выделению регуляторов из слизистой кишечника – *секретина* и *холецистокинина* (панкреозимина). Секретин действует на поджелудочную железу и стимулирует выделение сока, богатого бикарбонатами, H_2O, но не ферментами. Холецистокинин действует на поджелудочную железу и желчный пузырь, стимулирует выделение панкреатического сока, богатого ферментами, и сокращение желчного пузыря. *Энтерокринин* действует на слизистую кишечника и стимулирует секрецию желез кишечника. *Вилликинин* стимулирует движение ворсинок слизистой кишечника и способствует продвижению пищи [13].

Основным органом, в который поступают ксенобиотики у животных организмов, являются печень или ее аналоги. Многие из них гепатотоксичны.

4.3. Гепатотоксичность

Гепатотоксичность – это свойство химических веществ, действуя на организм немеханическим путем, вызывать структурно-функциональные нарушения печени или ее аналога.

Гепатотоксическим действием обладают:

1. Антропогенные токсиканты: алифатические углеводороды (гептан), алкоголи, эфиры и эпоксисоединения (диоксан), ацетаты (этил-ацетат), алифатические галогенированные углеводороды (дихлорэтан), карбоновые кислоты и их ангидриды (фталиевый ангидрид), этаноламин, цианиды и нитрилы (ацетонитрил), ароматические углеводороды (бензол), фенол и его производные, ароматические галогенированные углеводороды (бензилхлорид), ароматические амины, нитросоединения (динитробензол), галогены и металлы.

2. Природные соединения: растительного происхождения (альбитоцин), микотоксины (афлатоксины), бактериальные токсины (экзотоксины группы клостридиум) и др.

3. Медикаментозные средства: антибиотики (хлорамфеникол), фунгициды (гризеофульвин), протозооциды (метронидазол), противотуберкулезные средства (изониазид), противовирусные средства (цитарабин), анестетики (галотан), психотропные препараты (фенотиазины), сердечно-сосудистые средства (хинидин), противоопухолевые препараты.

Высокая чувствительность печени к ксенобиотикам определяется тем, что:

1) ксенобиотики попадают прежде всего в печень после всасывания;

Репозиторий БГУ

2) главным образом печень отвечает за метаболизм ксенобиотиков (хотя этот процесс идет и в других тканях);

3) жирорастворимые ксенобиотики выводятся в желчь печенью.

Патологические состояния печени химической этиологии у животных и человека делятся на два типа: цитотоксические и холестатические. Реакция печени на поступление различных ксенобиотиков однотипна и не специфична [7, 23, 25, 26].

При этом формируется ограниченное количество патологических реакций, а именно:

1. Стеатоз – жировое перерождение печени, связанное с накоплением жиров в печени и снижением содержания в плазме крови липопротеинов.

2. Некроз – это дегенеративный процесс, приводящий к клеточной гибели.

3. Холестаз – проявляется нарушением процесса желчевыведения.

4. Фиброз (цирроз) – конечный результат хронически протекающих патологических процессов, развивающихся в печени при действии ксенобиотиков и некоторых эндогенных метаболитов.

5. Канцерогенез – многие гепатотоксиканты выступают в роли инициаторов опухолевого роста, который реализуется при действии «промоторов».

4.4. Запасание и распределение пищевых молекул

Запасаемые молекулы должны быть *нерастворимыми, компактными* и *нетоксичными*.

Многие витамины и минеральные вещества, включая железо, токсичны, поэтому запасаются в малых количествах, обычно в комплексах со специализированными белками в печени; в скелете запасаются кальций и фосфор. Различия между биохимическими процессами запасания энергоемких молекул (гликоген, триацилглицеролы) и биохимическими процессами в состоянии покоя не являются абсолютными.

Человек способен не только получать глюкозу с продуктами питания, но и синтезировать ее в *глюконеогенезе* из аминокислот, освобождающихся при распаде белков. Глюконеогенез из аминокислот достаточно медленный и расточительный процесс, поскольку при этом увеличивается выведение аминных групп из метаболизма. В печени небольшие количества белка и свободных аминокислот (глутамин) создают резервный фонд предшественников для синтеза как белков и нуклеиновых кислот, так и глюкозы. Животные, которые используют белки для энергетических нужд, быстро истощаются.

К энергоемким молекулам, которые могут запасаться в больших количествах, относятся гликоген, триацилглицеролы, эфиры глицерола, свободные жирные кислоты (12–24 атомов углерода). Резервирование углеводов сопровождается задержкой воды. Углеводы и глицерол метаболизируются в аэробных и анаэробных условиях, а длинноцепочечные жирные кислоты окисляются только в присутствии кислорода. В связи с этим резервирование и использование липидов

Репозиторий ВГУ

возможно только у живых организмов с эффективным потреблением и транспортом кислорода.

Полный распад ненасыщенных жирных кислот сопровождается меньшим освобождением энергии (примерно на 1–2% на каждую двойную связь), чем насыщенных с тем же числом углеродных атомов. Триацилглицеролы, содержащие остатки насыщенных жирных кислот, упакованы более плотно и имеют более высокую температуру плавления по сравнению с содержащими остатки ненасыщенных жирных кислот. У человека наличие ненасыщенных жирных кислот в триацилглицеролах и фосфолипидах определяет жидкостность липидсодержащих структур при нормальной температуре тела. Животные и человек могут синтезировать насыщенные (пальмитиновая, стеариновая, миристиновая) и мононенасыщенные жирные кислоты (пальмитолеиновая и олеиновая). Они не могут синтезировать жирные кислоты с 2 и 3 двойными связями (линолевая, линоленовая). В клетках нет десатураз, катализирующих процесс введения двойных связей в жирные кислоты.

Липиды и крахмал, сконцентрированные в зернах, орехах и семенах, являются пищевыми молекулами для животных. Часто семена защищаются от травоядных животных специальными белками, алкалоидными токсинами или жирными кислотами. Так, в бобах растения *Ricinus communis*, производящего касторовое масло, содержится белок рицин и рицинолевая кислота, которая входит в состав 90% триацилглицеролов растения. Пищеварительные липазы животных не способны гидролизовать липиды, содержащие рицинолевую кислоту. Это способствует быстрому перемещению таких липидов по пищеварительному тракту. На этом основано применение касторового масла как слабительного средства [13].

Репозиторий ВГУ

Г Л А В А 5. **КСЕНОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ СРЕДЫ И ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ**

Ксенобиотики – это чужеродные вещества, поступающие в организм. Животный организм является *открытой системой*, находящейся в состоянии постоянного обмена веществами и энергией с окружающей средой. В связи с этим для понимания экологической биохимии необходимо знание особенностей метаболизма и его регуляции при поступлении в организм ксенобиотиков.

5.1. Ксенобиологический профиль среды

Многочисленные молекулы окружающей среды делятся на биотические и абиотические. Для экологической биохимии интерес представляют молекулы, обладающие *биодоступностью*, т.е. способностью взаимодействовать немеханическим путем с живыми организмами. Как правило, это соединения, находящиеся в газообразном или жидком состоянии, в форме водных растворов, адсорбированные на частицах почвы и различных поверхностях, твердые вещества, но в виде мелко дисперсной пыли (размер частиц менее 50 мкм), вещества, поступающие в организм с пищей. Они делятся на две группы:

1. Часть биодоступных соединений утилизируется организмами, участвуя в процессах их пластического и энергетического обмена с окружающей средой, т.е. выступают в качестве *ресурсов среды обитания*.

2. Другие соединения при поступлении в организм животных и растений не используются как источники энергии или пластического материала. Они, действуя в достаточных дозах и концентрациях, способны модифицировать течение нормальных биохимических и физиологических процессов. Поэтому они называются *ксенобиотиками*.

Совокупность чужеродных веществ, содержащихся в окружающей среде (воде, почве, воздухе и живых организмах) в форме (агрегатном состоянии), позволяющей им вступать в физико-химические и биохимические взаимодействия с биологическими объектами экосистемы, составляет ксенобиологический профиль биогеоценоза. Ксенобиологический профиль следует рассматривать как один из важнейших факторов внешней среды (наряду с температурой, освещенностью, влажностью и т.п.), который может быть описан качественными и количественными характеристиками [9].

Важным элементом ксенобиологического профиля являются чужеродные вещества, *содержащиеся в органах и тканях живых существ,* поскольку все они рано или поздно потребляются другими организмами-гетеротрофами (т.е. обладают биодоступностью). Напротив, химические вещества, фиксированные в твердых, не дисперги-

Репозиторий ВГУ

руемых в воздухе и не растворимых в воде объектах (скальные породы, твердые промышленные изделия, стекло, пластмассы и др.) не обладают биодоступностью. Их рассматривают как потенциальные источники формирования ксенобиологического профиля среды.

Ксенобиотические профили среды, сформировавшейся в ходе эволюции, называют *естественными ксенобиотическими профилями.* Они неодинаковы в разных регионах Земли. Биоценозы, существующие в этих регионах (биотопах), в той или иной степени адаптированы к соответствующим естественным ксенобиотическим профилям. Ксенобиотический профиль может изменяться в результате природных катастроф или хозяйственной деятельности человека. Химические вещества, накапливающиеся в среде в несвойственных ей количествах и являющиеся причиной изменения естественного ксенобиологического профиля, называются *экополлютантами* (загрязнителями). Далеко не всегда это приводит к негативным биологическим процессам у живых организмов. Если же инициируются токсические процессы в биоценозе, то такие вещества называют *экотоксикантами* [7, 9].

5.2. Роль эко(токсико)кинетики в экологической биохимии

Раздел экологической химии, рассматривающий судьбу ксенобиотиков в окружающей среде: источники их появления; распределение в абиотических и биотических элементах окружающей среды; превращения ксенобиотика в среде обитания; элиминация из окружающей среды.

В окружающей среде функционируют механизмы (биотические и абиотические), служащие для удаления (элиминации) ксенобиотиков. Вещества, оказывающиеся резистентными к процессам разрушения и длительно персистирующие в окружающей среде, как правило, являются опасными ксенобиотиками (ДДТ – 10 лет, атразин – 2 года, фенантрен – 135 дней и др.).

Однако подавляющее большинство веществ подвергаются в природе абиотической и биотической трансформации. Среди абиотических процессов важнейшими для разрушения ксенобиотиков являются фотолиз (разрушение под влиянием света, например, полициклических ароматических углеводородов), гидролиз (разрушение эфирных связей в фосфорорганических соединениях) и окисление. Абиотическое разрушение химических веществ происходит медленно.

Намного быстрее происходит трансформация ксенобиотиков живыми организмами с помощью специальных ферментативных систем (особенно бактериями и грибами). Эти процессы изучаются в рамках экологической биохимии. Если ксенобиотик не может попасть во внутреннюю среду организма, то он не представляет особой опасности. Однако, попав внутрь из абиотической фазы (воды, почвы, воздуха) или из пищи (трофическая передача), ксенобиотики могут накапливаться – *биоаккумуляция*. Наилучшие условия для биоаккумуля-

Репозиторий ВГУ

ции создаются у водных организмов. Так, у рыб фактор биоаккумуляции (отношение концентрации ксенобиотика в тканях рыб и в воде в состоянии равновесия) для ДДТ составляет 127000, эндрина – 6800, лептофоса – 750. Для организмов более опасными являются гидрофобные (липофильные) ксенобиотики, поскольку они легко накапливаются в липидсодержащих компартментах клеток (мембраны, липоциты).

Биоаккумуляция может лежать в основе не только хронических, но и отсроченных острых токсических эффектов. Так, быстрая потеря жира, в котором накоплено большое количество вещества, приводит к выходу ксенобиотика в кровь. Мобилизация жировой ткани у животных нередко отмечается в период размножения. В экологически неблагополучных регионах это может сопровождаться массовой гибелью животных при достижении ими половой зрелости. Стойкие поллютанты могут также передаваться потомству, у птиц и рыб – с содержимым желточного мешка, у млекопитающих – с молоком кормящей матери. При этом возможно развитие эффектов у потомства, не проявляющихся у родителей.

Химические вещества могут перемещаться по пищевым цепям от организмов-жертв к организмам-консументам. Для высоколипофильных веществ это перемещение может сопровождаться увеличением концентрации ксенобиотика в тканях каждого последующего организма – звена пищевой цепи. Этот феномен называется *биомагнификацией.* Так, в США для борьбы с переносчиком «голландской болезни» вязов вязовым заболонником *Scolytes multistriatus* деревья обрабатывали ДДТ. Часть пестицида попадала в почву и в организм дождевых червей. У питающихся ими перелетных дроздов развивалось острое отравление, что приводило к их гибели или откладыванию стерильных яиц. В результате борьба с заболеванием деревьев привела к почти полному исчезновению перелетных дроздов [7, 9, 21].

В рамках *экологической биохимии* на первое место выходят биохимические процессы, определяющие судьбу ксенобиотика в конкретном организме, и прежде всего, млекопитающих и человека. На концентрацию вводимого ксенобиотика оказывают влияние 5 основных факторов, описываемых LADME-системой: 1) liberation – освобождение из вводимой формы; 2) absorption – всасывание, поглощение; 3) distribution – распределение; 4) metabolism – обмен, превращения; 5) elimination – выведение. Частным примером является фармакокинетика лекарственных препаратов.

5.3. Эко(токсико)динамика

Раздел химической экологии, рассматривающий конкретные механизмы развития и формы химико-биологического процесса, вызванного действием ксенобиотика на биоценоз и/или отдельные виды, его составляющие.

Выделяют прямое, опосредованное и смешанное действие ксенобиотиков. Прямое действие – это непосредственное поражение организмов определенной популяции или нескольких популяций (биоценоза) ксенобиотиком или совокупностью ксенобиотиков данного ксенобиотического профиля среды. Опосредованное – это действие ксенобиотического профиля среды на биотические или абиотические элементы среды обитания популяции, в результате которого условия и ресурсы среды перестают быть оптимальными для ее существования. Сочетание

Репозиторий ВГУ

элементов прямого и опосредованного действия ксенобиотиков определяет смешанное действие.

В рамках *экологической биохимии* рассматриваются молекулярные механизмы влияния ксенобиотика на химический состав, обмен веществ и функциональную активность живого организма. Частным примером является фармакодинамика лекарственных препаратов [7, 9].

5.4. Экотоксичность

Это способность данного ксенобиологического профиля среды вызывать неблагоприятные эффекты в соответствующем биоценозе.

Неблагоприятные экологические эффекты целесообразно рассматривать на уровне:

– организма (аутэкотоксические) – провляются снижением резистентности к другим действующим факторам среды за счет нарушений в метаболизме, понижением активности, развитием патологических процессов, канцерогенезом, нарушениями репродуктивной функции и др.;

– популяции (демэкотоксические) – проявляются гибелью популяции, ростом заболеваемости, смертности, уменьшением рождаемости, увеличением числа врожденных дефектов ферментативных систем, нарушением демографических характеристик и др.;

– биогеоценоза (синэкотоксические) – проявляются изменением популяционного спектра ценоза, вплоть до исчезновения отдельных видов и появления новых, не свойственных данному биоценозу, нарушением межвидовых отношений.

В изучении индивидуальной экотоксичности широко используются биохимические методы (оценка острой, подострой, хронической токсичности, дозы и концентрации, вызывающие мутагенное, канцерогенное и иное неблагоприятное действие). В сложных системах используют качественные и полуколичественные показатели «опасность», «экологический риск».

Выделяют следующие наиболее изученные механизмы экотоксичности:

1. Прямое действие ксенобиотика, приводящее к массовой гибели представителей чувствительных видов. Здесь надо учитывать основной закон токсикологии – чувствительность различных видов живых организмов к химическим веществам всегда различна. Так, хлорид свинца, убивающий дафний в дозе 10 мкг/л, малоопасен для других видов.

2. Прямое действие ксенобиотика, приводящее к развитию аллобиотических состояний и специальных форм токсического процесса. Общая схема: поступление ксенобиотика снижает резистентность организма, что делает его чувствительным к другим факторам, например к инфекциям. Применение диоксина на территории Южного Вьетнама привело к росту опухолей и снижению рождаемости.

3. Эмбриотоксическое действие ксенобиотиков. ДДТ, поступающий в организм птиц, приводит к истончению скорлупы яиц и нарушению процесса высиживания, что ведет к гибели птенцов.

4. Прямое действие продукта биотрансформации ксенобиотика с необычным эффектом. В штате Флорида в реке ниже предприятия, перерабатывающего орехи, увеличивалось количество самок живородящих рыб (карпозубые) с признаками маскулинизации. Оказалось, что в сточных водах присутствовали фитостеролы, которые речными микроорганизмами превращались в андрогенный гормон.

5. Опосредованное действие путем сокращения пищевых ресурсов среды обитания. Применение пестицидов уменьшает количество гусениц – кормовой

Репозиторий ВГУ

базы птиц, что ведет к их гибели. В развивающихся странах из-за недостаточного питания у детей развивается квашиоркор – основная причина детской смертности.

6. Взрыв численности популяции вследствие уничтожения вида-конкурента. Применение синтетических пестицидов для борьбы с некоторыми видами вредителей растений привело к резкому увеличению клещей, использующих растение в качестве пищи [7, 9].

5.5. Экологическая биохимия питания

В пище человека содержится множество химических веществ, часть из которых относится к ксенобиотикам. Ксенобиотики 1) могут являться нормальным компонентом продуктов питания, 2) могут обогащать пищу в процессе ее приготовления (например, пищевые добавки), а также 3) могут по каким-либо причинам явиться контаминантами приготовленной пищи. Некоторые пищевые добавки целенаправленно добавляются к пище с целью оптимизации ее приготовления. Химикаты (непрямые добавки в пище) используются в технологиях ее приготовления, хранения, консервации и т.п. Контаминанты (ртуть, мышьяк, селен и кадмий) поступают из окружающей среды и являются результатом урбанизации общества. Из природных источников возможно получение основных компонентов пищи (белки, жиры, углеводы); веществ, способных изменять функционирование органов и тканей (аллергия, развитие зоба, ингибиторы протеолиза и др.); веществ, являющихся ядами для потребителя пищи. *Пищевыми добавками* называют природные или синтетические, физиологически активные и инертные химические вещества, целенаправленно или случайно добавленные к пище.

Прямые пищевые добавки включают вещества, которые вводятся в пищу в процессе ее приготовления для придания ей определенных характеристик. К таким пищевым добавкам относят антиоксиданты, консерванты, витамины, минералы, ароматизаторы, красители, эмульгаторы, стабилизаторы, закислители, и др.

Наличие пищевой добавки по решению стран Европейского Сообщества должно указываться на этикетке. При этом она может обозначаться как индивидуальное вещество или как представитель конкретного функционального класса в сочетании с кодом Е. Согласно предложенной системе цифровой кодификации пищевых добавок, их классификация выглядит следующим образом: Е100–Е182 – красители; Е200 и далее – консерванты; Е300 и далее – антиокислители (антиоксиданты); Е400 и далее – стабилизаторы консистенции; Е450 и далее, Е1000 – эмульгаторы; Е500 и далее – регуляторы кислотности, разрыхлители; Е600 и далее – усилители вкуса и аромата; Е700–800 – запасные индексы; Е900 и далее – глазирующие агенты, улучшители хлеба. Применение пищевых добавок требует знания предельно допустимой концентрации чужеродных веществ – ПДК (мг/кг), допус-

Репозиторий ВГУ

тимой суточной дозы – ДСД (мг/кг массы тела) и допустимого суточного потребления – ДСП (мг/сут), рассчитываемого как произведение ДСД на среднюю величину массы тела – 60 кг.

Непрямые пищевые добавки включают вещества, вошедшие в состав пищи непреднамеренно (например, при контакте пищи с технологическим оборудованием или упаковочным материалом). Из пищевых загрязнителей чаще всего рассматриваются три группы: 1) афлатоксины; 2) пестициды; 3) диоксины и свинец.

Особый интерес представляет использование химических компонентов пищи (витамины, минералы) для *лечения специфических заболеваний* в дозах, превышающих суточную потребность. Клиническое использование железа, фтора, йода исследовано достаточно детально. Безопасность использования витаминов и минералов в качестве добавок к пище или компонентов лекарств зависит от: 1) цитотоксичности химического вещества; 2) его химической формы; 3) общего суточного потребления; 4) длительности и регулярности потребления; 5) морфо-функционального состояния тканей-мишеней и органов человека. Жирорастворимые витамины являются более токсичными, чем водорастворимые из-за их повышенного накопления в липидной фазе мембран клеток и низкой скорости элиминации.

Витамин А относится к субстанциям, о токсичности которых неоднократно сообщалось. При оценке токсичности следует учитывать все источники витамина А (пищевые продукты с высоким содержанием витамина А – яйца, печень; обогащенные продукты – молоко, готовые к употреблению каши) и пищевые добавки. Почти все случаи интоксикации витамином А связаны с употреблением пищевых добавок, специально обогащенных витамином А.

Витамин Е используется в пище как нутриент и как антиоксидант. Считают, что витамин Е относительно безопасен при ежедневном приеме в дозе до 200 мг/сутки; токсические эффекты описаны при ежедневном приеме витамина в количестве 2148 мг/сутки.

Пиридоксин, как и все водорастворимые витамины, менее токсичен из-за быстрого метаболизма и возможности быстрого выведения через почечный фильтр. Не описаны токсические эффекты для алиментарного применения витамина B_6.

Витамин С используется с теми же целями, что и витамин Е (аскорбиновая кислота является водорастворимым антиоксидантом). Известны рекомендации об использовании витамина С с профилактической и лечебной целями в дозах, десятикратно превышающих суточную потребность. Индивидуальная непереносимость аскорбиновой кислоты встречается достаточно редко.

Ниацин в высоких дозах (граммы) используется для снижения уровня холестерола в крови. Практически во всех случаях применения высоких доз никотиновой кислоты проявляются токсические эффекты (покраснение кожных покровов, приливы к голове).

Медь является наиболее токсичным, но наиболее важным микроэлементом. В следовых количествах медь находят практически во всех продуктах питания, что не вызывает интоксикаций, за исключением заболевания Вильсона–Коновалова (совместное поражение печени и ядер гипоталамуса). Человек менее чувствителен к меди по сравнению с млекопитающими (овцы). Токсичность меди следует увязывать с ее взаимодействием с железом, цинком и белками.

Железо в виде окислов придает окраску пище. В США фосфаты, пирофосфаты, глюконаты, лактаты, сульфаты железы и восстановленное железо раз-

Репозиторий ВГУ

решены в качестве пищевых добавок. Всасывание негеминового железа строго контролируется в слизистой кишечника. Избыточное поступление железа с пищей и действие веществ, ускоряющих его всасывание, может привести к накоплению железа в организме. Задержка и накопление железа в организме человека весьма индивидуальны и не поддерживаются общими закономерностями.

Цинк в виде нескольких соединений используется в пищевых добавках. Кормление птицы и скота обогащенным цинком кормом может привести к накоплению этого металла в мясных пищевых продуктах. Известно, что индивидуальная непереносимость цинка человеком весьма вариабельна. Однако, применение в пище средних концентраций солей цинка в качестве пищевых добавок, как правило, не сопровождается развитием интоксикации.

Селен является одним из самых токсичных элементов. До настоящего времени потребности в селене научно не обоснованы, а широкое применение селена в пищевых добавках базируется на интуитивных предпосылках. Следует учитывать географические провинции с разным содержанием селена в объектах окружающей среды при использовании пищевых добавок, обогащенных селеном, с целью предупреждения осложнений.

Рассмотрим некоторые ксенобиотики, используемые для *улучшения органолептических и физико-химических свойств пищи.*

1. *Сахарин* в 300–500 раз слаще, чем сахароза. Не накапливается в тканях, не подвергается метаболизму и выводится из организма в неизмененном виде. Не оказывает мутагенное действие. В некоторых случаях способствует развитию экспериментальных опухолей (рак мочевого пузыря). Однако в эпидемиологических исследованиях угроза риска развития опухолей пока не нашла подтверждения.

2. *Цикламат* использовался как подсластитель. Его метаболизм зависит от кишечной микрофлоры. После первого приема цикламат выводится в большом количестве без изменений. При повторных приемах в кишечнике возникают метаболиты, с которыми возможно связаны негативные эффекты препарата: развитие в эксперименте на крысах рака мочевого пузыря. И хотя этот эффект не был воспроизведен на собаках, мышах, хомячках и приматах, в 1969 году применение цикламата в США было запрещено.

3. *Аспартам* как заменитель сахара менее токсичен, поскольку при его гидролизе получаются фенилаланин и аспарагиновая кислота. Накопление фенилаланина может ухудшить состояние больных фелилпировиноградной олигофренией (фенилкетонурия).

Наиболее употребляемые подсластители: сорбит, ацесульфам калия (сунет), аспартам (санекта, нутрасвит, сладекс), цикламовая кислота и ее соли (споларин, цикломаты), изомальтит (изомальт), сахарин и его соли, сукралоза (трихлоргалактосахароза), тауматин, глицирризин, неогесперидиндигидрохалкон (неогесперидин ДС), мальтит и мальтитный сироп, лактит, ксилит.

4. *Пищевые красители* включают природные и синтетические субстанции. К природным относят кармин, паприку, шафран и турмерик. Некоторые нутриенты придают окраску пищевым продуктам (каротины, рибофлавин, хлорофиллы) и входят в состав соков, масел и экстрактов овощей и фруктов. Синтетические соединения вводятся в пищу на этапах ее приготовления и сертифицируются государством. Некоторые из потенциальных красителей могут участвовать в малигнизации клеток (чаще всего они не канцерогены, а промоторы). Синтетические пищевые красители и некоторые ароматизаторы (метилсалицилат) могут вызывать гиперактивность детей. Случаи гиперактивности могут завершаться локальными поражениями мозга (инсульт). Однако проблема окраски пищи как с целью ее при-

Репозиторий ВГУ

влекательности, так и биомедицинского применения, остается актуальной и в настоящее время. Несанкционированное введение добавок, улучшающих внешний вид и маркетинговую стоимость продуктов питания, получило очень широкое распространение и требует обязательного регламентирования органами госнадзора.

5. *Консерванты* включают антиоксиданты и антимикробные агенты. Антиоксиданты подавляют развитие изменений цвета, питательной ценности и формы продуктов путем подавления перекисного окисления липидов мембран пищевых продуктов, а также свободных жирных кислот. Антимикробные агенты подавляют рост микроорганизмов, дрожжей, продукты жизнедеятельности которых вызывают интоксикации или развитие инфекционного процесса, а также изменяют физико-химические свойства продуктов питания. Химическим консервантам противостоят методы сохранения пищи при низких температурах или использования метода облучения пищи. Однако технические средства пока проигрывают химическим из-за дороговизны и радиофобии людей.

5.1. К *антиоксидантным пищевым добавкам* относят аскорбиновую кислоту, пальмитиновый эфир аскорбиновой кислоты, токоферолы, бутилированный гидроксианизол (BHA) и бутилированный гидрокситолуен (BHT), этоксиквин, пропиловый эфир галловой кислоты и t-бутилгидрохинон (TBHQ). Широко используемые антимикробные агенты (нитриты, сульфиты) также обладают антиоксидантными свойствами. На протяжении многих лет BHA и BHT считаются потенциально опасными веществами. Оба относятся к жирорастворимым антиоксидантам и способны увеличивать в плазме крови активность некоторых ферментов печени. Антиоксиданты обеспечивают защиту от некоторых электрофильных молекул, которые могут связываться с ДНК и оказывать мутагенное действие и индуцировать опухолевый рост. Введение BHA в больших дозах (2% от диеты) вызывает гиперплазию клеток, папилломы и малигнизацию клеток в желудке некторых животных. В то же время BHA и BHT обеспечивают защиту клеток печени от действия канцерогена – диэтилнитрозомочевины.

5.2. *Антимикробные агенты* (нитриты и сульфиты). Нитриты подавляют рост Clostridium botulinum и тем самым уменьшают риск ботулизма. Нитриты взаимодействуют с первичными аминами и амидами с образованием соответствующих N-нитрозодериватов. Многие, но не все N-нитрозосоединения являются канцерогенами. Аскорбиновая кислота и другие восстанавливающие агенты подавляют эти реакции нитритов, особенно в кислой среде желудка. Некоторые нитрозамины возникают в процессе приготовления пищи, но основная масса нитрозаминов образуется в желудке. Неканцерогенные токсические эффекты нитритов проявляются при их высокой концентрации. У людей, употребляющих долго относительно большие количества нитритов развивается метгемоглобинемия.

Диоксид серы и его соли используются для *предупреждения развития коричневой окраски продуктов питания*, для отбеливания, антимикробного действия широкого спектра и в качестве антиоксидантов. Сульфиты весьма реактивны, в связи с чем допускается только низкое их содержание в продуктах питания. Сульфиты способны вызывать астму у чувствительных индивидуумов. Около 20 смертных случаев связаны с идиосинкразией людей к нитритам (особая чувствительность к напиткам, содержащим дополнтельно и сульфиты). Примерно 1–2% больных бронхиальной астмой проявляют повышенную чувствительность к сульфитам. Патогенез сульфит-индуцированной астмы пока не ясен. Возможна патогенетическая роль IgE-опосредованных реакций.

Токсичные субстанции пищи впервые были суммированы в списке «Substances Generally Recognized as Safe» – GRAS-субстанции – в 60-х годах прошлого

Репозиторий ВГУ

века. Это не государственный список. Он постоянно пополняется и выполняет важную роль в обеспечении безопасности питания людей и животных.

Пищевые контаминанты включают минералы и тяжелые металлы, микотоксины, токсины рыб шелфа, пестициды и органические вещества окружающей среды.

1. *Минералы и тяжелые металлы*. Их присутствие в продуктах питания зачастую определяет потенциальную токсичность пищи. Растительные пищевые продукты являются первичным источником минералов для людей и животных, поэтому следует учитывать региональные, возрастные и техногенные особенности минерального обмена растений, предназначенных для питания.

1.1. *Мышьяк* широко представлен в виде неорганических и органических соединений (III, V) в окружающей среде. Уровень содержания мышьяка в пище ниже 0,25 мг/кг. Мясо, птица и рыба являются основными источниками мышьяка. Диета без морепродуктов обеспечивает поступление до 0,04 мг мышьяка в день, а усредненная диета – 0,19 мг мышьяка в день. Метилированные соединения мышьяка менее токсичны, чем его неорганические соли. У людей, работающих на плавильных производствах, более 100 лет тому назад описаны опухолевый эффект мышьяка. Доказано, что один мышьяк не вызывает малигнизацию, необходимо присутствие коканцерогена.

1.2. *Селен*, как уже указывалось, один из наиболее токсичных микроэлементов. Он также широко распространен в объектах окружающей среды. Дефицит селена в окружающей среде имеется в Новой Зеландии и в части регионов Китая, избыток – в некоторых регионах Китая и в штате Северная Дакота (США). Растения могут аккумулировать селен. В них он переходит в состав органических соединений. При отмирании растения селен возвращается в почву и используется другими растениями. Зерновые могут аккумулировать большие количества селена из селен-обогащенных почв. В таких регионах пастбищное содержание животных может привести к интоксикации животных, а при хроническом отравлении возможно развитие поражения зрения и «щелочной болезни». При избыточном поступлении селена возникают нарушения органов пищеварительного тракта и гепатобилиарной системы. Хроническая интоксикация жителей селеном описана в Китае. Основные симптомы: ломкость волос, отсутствие пигментации новых волос, хрупкие ногти с пятнами, продольные стрии кожи. Неврологические симптомы обнаруживались у половины пораженных людей. Аналогичные симптомы описаны также у жителей Венесуэлы, проживающих в регионах, обогащенных селеном.

1.3. *Ртуть* содержится в пищевых продуктах, за исключением рыбы, в концентрации ниже 50 нг/г. Рыбы содержат от 10 до 1500 нг/г в форме метилртути. Описаны ртутные отравления людей, которые питались хлебом из обработанного алкил-ртутью зерна пшеницы. Хронические отравления малыми концентрациями ртути гораздо труднее диагностировать. Маркетинговый лимит для ртути 0,4–1,0 мг/кг рыбы установлен в США, Канаде, Финляндии, Швеции и Японии.

1.4. *Кадмий* – высокотоксичный элемент, который аккумулируется в биологических объектах и характеризуется длительным периодом полувыведения. Хроническое воздействие низких доз кадмия ведет к поражению почек. Почечная ткань – ткань-мишень для кадмия, где его период полужизни составляет 30 лет. Кадмий поступает в организм с пищей. Растениями кадмий аккумулируется из почв, обогащенных минеральными удобрениями с примесью кадмия. Пшеница, овощи и фрукты, выращенные на почвах, удобренных суперфосфатами, содержат намного больше кадмия, чем полученные на неудобренных землях. Загрязнение атмосферы кадмием ведет также к накоплению этого элемента в пищевых про-

Репозиторий ВГУ

дуктах. Это особенно ярко проявляется на полях в районе аэропортов и авиационных военных баз. Ежедневный прием кадмия не должен превышать 25–60 мкг. Кадмий аккумулируется в почках, печени, легких и поджелудочной железе. Почечная ткань наиболее чувствительна к хроническому воздействию малыми дозами кадмия. Интоксикация кадмием сопровождается развитием дисфункции почек, гипертензии, повреждения печени, легких, репродуктивных органов и костей. В 1955 году в Японии описано заболевание «ouch-ouch» (ой-ой), связанное с промышленным загрязнением пищи и воды кадмием. Отравление описано в постменопаузальном периоде жизни женщин, которые применяли низкокальциевую и низкобелковую диеты. Основными симптомами были боли в костях, люмбаго и утиная походка. В развитии заболевания важное место занимали остеомаляция, остеопороз, атрофия почек и ее дегенерация. Заболевание вызывается сочетанием низкого потребления кальция, мобилизацией кальция из костей во время беременности и кадмий-индуцированной кальцийурией.

1.5. *Нитраты, нитриты, нитрозамины*. Нитраты являются нормальными метаболитами любого живого организма и в связи с этим широко распространены в природе. При потреблении в повышенном количестве нитраты в пищеварительном тракте частично восстанавливаются до нитритов. Механизм токсического действия нитритов в организме заключается в их взаимодействии с гемоглобином крови и в образовании метгемоглобина (1 мг нитрита натрия может перевести в метгемоглобин 2 г гемоглобина). Токсичность нитритов зависит от активности метгемоглобинредуктазы, которая катализирует превращение метгемоглобина в гемоглобин, способный транспортировать кислород. Нитраты индуцируют развитие хронического полигиповитаминоза. Допустимая суточная доза нитрита не превышает 0,2 мг/кг массы тела. Острая интоксикация отмечается при одноразовой дозе 200–300 мг, летальный исход при 300–2500 мг. Предельно допустимая доза по воде 45 мг/л.

Из нитратов в присутствии различных аминов могут образовываться N-нитрозамины, 80% из которых обладают канцерогенными свойствами. Нитрозамины могут образовываться в окружающей среде. С пищей человек ежесуточно получает 1 мкг нитрозосоединений, с питьевой водой – 0,01 мкг, с вдыхаемым воздухом – 0,3 мкг. Помимо растений, источником нитратов и нитритов для человека являются мясные продукты, а также колбасы, рыба, сыры, в которые добавляют нитрит натрия или калия в качестве пищевой добавки (как консервант или для сохранения привычной окраски мясных продуктов). Сохранение окраски связано с тем, что NO-миоглобин сохраняет красную окраску даже после термической обработки.

2. *Пестициды* подразделяются на фунгициды, гербициды, инсектициды и родентициды. По химическому строению они делятся на органохлорины, органофосфаты, пиретрины и карбаматы. Пестициды – токсины для живых организмов, включая человека. Пестициды целенаправленно вводятся в окружающую среду для подавления роста и жизнедеятельности грибов, растений, насекомых, грызунов, что в конечном итоге загрязняет пищу и через нее (а также воздух, воду и прямой контакт) воздействует негативно на человека и животных.

Пестициды применяют на территориях, занятых нежелательными вредителями, поскольку невозможно оказать специфическое воздействие на конкретный организм вредителя. Большинство пестицидов нестабильно в окружающей среде, что позволяет использовать относительно высокие локальные концентрации действующих субстанции при высокой вероятности нахождения вредителя. Локальное применение пестицидов – основной и высоко эффективный принцип их ис-

Репозиторий ВГУ

пользования. Напротив, органохлориновые инсектициды (*ДДТ – дихлордифенилтрихлорэтан*) устойчивы и персистируют в окружающей среде длительное время. Их локальное применение мало эффективно или даже вредоносно для полезных видов растений.

ДДТ сыграл важнейшую роль в борьбе с малярией, за что в 1948 году Пауль Мюллер был удостоен Нобелевской премии. Однако благодаря своей стойкости и летучести (период обращения вокруг земли около месяца) ДДТ быстро распространился по всей планете и был обнаружен в жировом слое пингвинов и в грудном молоке женщин. Это и привело к запрещению его применения.

Токсичность пестицидов для человека связана с присутствием в его организме клеток-мишеней, аналогичных таковым у вредителей, подлежащих уничтожению. Селективная токсичность связана с различиями в скоростях метаболических путей у человека и вредителей. Более высокий метаболизм уменьшает выраженность токсического действия пестицида. Если скорость метаболизма достаточно высока, то трудно ожидать от пестицида эффективного цитостатического эффекта. Гидролиз органофосфорных инсектицидов намного быстрее у млекопитающих по сравнению с насекомыми, что и обеспечивает относительную резистентность теплокровных к этим ядам.

Такая резистентность определяет накопление токсических веществ в различных объектах окружающей среды за счет их замедленного распада. Кроме того, способные к биоаккумуляции пестициды, как правило, жирорастворимы, что замедляет их выделение из организма. Явление биоаккумуляции затрагивает пищевые цепи и ведет к накоплению пестицидов в высших организмах.

Органофосфаты и карбаматы убивают насекомых благодаря подавлению активности ацетилхолинэстеразы, важного для нервной системы фермента, который расщепляет нейротрансмиттер – ацетилхолин. У человека и животных также присутствует эта ферментативная система, ингибирование которой лежит в основе побочного действия инсектицидов на организм человека. Основное различие между органофосфатными и карбаматными пестицидами заключается в скорости ферментативного гидролиза субстанций с освобождением фосфорильной или карбамоильной групп. Этап гидролиза для ацетилхолина составляет миллисекунды, карбаматов – секунды-минуты, для органофосфатов – часы-сутки. Поэтому отравление карбаматами идет по механизму обратимого ингибирования, органофосфатами – по механизму необратимого ингибирования (хотя оба вещества работают как конкурентные ингибиторы).

При длительном поступлении в организм пестициды аккумулируются преимущественно в нервной и жировой ткани. Хроническая нейротоксичность пестицидов является ведущим механизмом пролонгированного их действия. Так хроническое поступление алкилированной ртути сопровождается тремором, дискоординацией, параличами и другими симптомами поражения ЦНС. Описаны отравления с симптомами поражения нервной системы при использовании фунгицидов на основе метилртути. Пестициды на основе органофосфорных соединений оказывают отсроченный нейротоксический эффект, связанный с нарушением регенерации микротрубочек нейронов.

Нейротоксическое действие пестицидов приводит к изменению поведенческих реакций. Часто отмечают снижение способности к обучению, плохую память, гиперактивность, агрессивность, нарушение тормозных процессов в ЦНС.

При исследовании многих пестицидов найдена их мутагенная активность. Механизм этого эффекта связан с прямым действием действующего начала пестицида на ДНК (алкилирование, поперечные сшивки, интеркаляция и пр.). Пести-

Репозиторий ВГУ

циды обладают как прямым мутагенным эффектом, так и опосредованным через продукты собственного метаболизма. Считают, что мутагенез пестицидов связан с возможным их канцерогенным действием.

Органохлориновые пестициды вызывают развитие экспериментальных опухолей. *Нитроанилиновые гербициды* способны индуцировать химический канцерогенез за счет нитрозаминов. *Этилен-бистиокарбаматные фунгициды* способны вызывать опухолевую трансформацию клеток за счет освобождения этилен-тиомочевины. Ряд других пестицидов (мирекс, аминотриазол, даминозид) демонстрируют при испытаниях признаки канцерогенного действия.

Эмбриональные ткани чувствительны к действию пестицидов. Хорошо известно тератогенное действие мирекса, кепона, ДДТ и некоторых фосфорорганических пестицидов. Тератогенное действие пестицидов заключается в поражении процессов нормального роста, дифференцировки и развития, дефектах развития нервной системы, проявлениях врожденных нарушений обмена веществ, скелета, кожи и висцеральных органов.

Интенсивное воздействие пестицидов вызывает серьезные нарушения репродуктивной функции мужчин и женщин (снижение либидо, образования половых клеток, выкидыши).

Пестициды способны индуцировать повышение активности некоторых ферментов у многих биологических объектах. Чаще всего речь идет о цитохром Р450 – системе метаболизма чужеродных веществ и процессах конъюгации метаболитов (монооксигеназы). Биохимические изменения сопряжены обычно с пролиферацией эндоплазматического ретикулума. Это проявление действия детоксицирующих механизмов.

Автоматизированный мониторинг пестицидов в СССР был введен в 1986 году. При мониторинге определяются остаточные количества 154 пестицидов, относящиеся к 45 группам в 262 видах пищевых продуктов, принадлежащих к 23 классам. Результаты мониторинга последних лет показывают возрастание общего количества пестицидов в продуктах растительного и животного происхождения.

3. *Синтетические органические соединения в окружающей среде*.

Наряду с пестицидами во внешней среде содержатся определяемые количества иных органических соединений, способных загрязнять пищу: диоксины, полиароматические углеводороды, модифицированные бифенильные соединения.

3.1. *Диоксины* являются побочными продуктами производства пластмасс, пестицидов, бумаги, дефолиантов, а также находятся в составе отходов металлургической, деревообрабатывающей и целлюлозо-бумажной промышленности. Группа диоксинов объединяет сотни веществ, каждое из которых содержит специфическую гетероциклическую структуру с атомами галогенов в качестве заместителей (например, 2,3,7,8-тетрахлордибензо-пара-диоксин – ТХДД). ТХДД по токсическому действию превосходит цианиды, стрихнин, заман, зарин, VX-газ. ТХДД выбран за эталон онкотоксичности, отличается высокой стабильностью, не поддается гидролизу и окислению, устойчив к высокой температуре, действию кислот, щелочей, не является горючим материалом, растворим в органических растворителях. Все диоксины относятся высокотоксичным веществам, обладающим мутагенными, канцерогенными и тератогенными свойствами. *Для диоксинов нет норм ПДК, они токсичны в любой дозировке*. Действие диоксинов потенцируют радиация, свинец, кадмий, ртуть, нитраты, хлорфенолы, соединения серы (II). В организм человека диоксины попадают, главным образом, с пищей (животные жиры, мясо, молочные продукты, рыба).

Репозиторий ВГУ

3.2. *Полициклические ароматические углеводороды* насчитывают более 200 представителей: 3,4-бенз(а)пирен, холантрен, перилен, дибенз(а)пирен. Все они канцерогенные вещества. К малотоксичным представителям этой группы относят антрацен, фенантрен, пирен, флуорантен. Они образуются в процессах сгорания нефтепродуктов, угля, дерева, мусора, пищи, табака. В пищевом сырье, полученном из экологически чистых растений, концентрация бенз(а)пирена 0,03–1,0 мкг/кг. Термическая обработка увеличивает его содержание в 50–100 раз. Полимерные упаковочные материалы могут играть роль загрязнителей пищевых продуктов: жир молока экстрагирует до 95% бенз(а)пирена из парафинобумажных пакетов или стаканчиков. С пищей взрослый человек получает 0,006 мг бенз(а)пирена в год. В интенсивно загрязненных районах эта доза возрастает в 5 и более раз.

4. *Природные токсиканты*.

Природные токсины, не уступающие по канцерогенной активности антропогенным ксенобиотикам, широко распространены и представляют постоянную угрозу для человека.

4.1. *Бактериальные токсины* загрязняют пищевые продукты и являются причиной большинства острых пищевых интоксикаций. *Staphylococcus aureus* продуцирует семь термостабильных энтеротоксинов пептидной природы. Эти грамположительные бактерии инактивируются уксусной, лимонной, фосфорной, молочной кислотами (pH 4,5), высокими концентрациями поваренной соли (12%), сахара (60–70%), 2–3 часовым кипячением. *Clostridium botulinum* продуцирует семь видов ботулотоксинов пептидной природы и является облигатным анаэробом с термостабильными спорами. Ботулотоксины инактивируются под влиянием щелочей и высоких температур (80˚С – 30 мин, кипячение – 15 мин). Ботулизм характеризуется высокой летальностью (7–9%). Сырое молоко, мясо и мясные продукты, вода могут быть причиной возникновения заболеваний, связанных с присутствием патогенных штаммов *Escherichia coli*, которые являются продуцентами термостабильных токсинов полипептидной природы с молекулярной массой от 4 до 10 кДа. В последние годы считают, что алкогольное поражение печени связано с действием эндотоксинов, образуемых микрофлорой кишечника под влиянием этанола.

4.2. *Микотоксины* являются вторичными метаболитами микроскопических плесневых грибов. Известно около 250 видов плесневых грибов, которые продуцируют до 120 микотоксинов. Афлатоксины представляют одну из наиболее опасных групп микотоксинов, обладающих выраженным канцерогенным действием. В настоящее время известны афлатоксины B_1, B_2, G_1, G_2 и еще 10 соединений, являющихся производными или метаболитами основной группы. По химической природе афлатоксины являются фурокумаринами. Афлатоксины не разрушаются в процессе обычной кулинарной обработки. Они плохо растворимы в воде, но растворимы в хлороформе, метаноле. Острое токсическое действие афлатоксинов связано с поражением печени. Отдаленные последствия действия афлатоксинов проявляются в виде канцерогенного, мутагенного и тератогенного эффектов. Установлена тесная корреляционная зависимость между частотой и уровнем загрязнения пищевых продуктов афлатоксинами и частотой первичного рака печени среди населения. Согласно данным ВОЗ, человек при благоприятной гигиенической ситуации потребляет в сутки до 0,19 мкг афлатоксинов. В России ПДК афлатоксина B_1 для молока 1 мкг/кг, для других пищевых продуктов – 5 мкг/кг, допустимая суточная доза – 0,005–0,01 мкг/кг массы тела.

Охратоксины продуцируются микроскопическими грибами рода *Aspergillus* и *Penicillium*, являются изокумаринами, которые связаны с L-фенилаланином пептидной связью. Охратоксины поражают преимущественно почки. При остром

Репозиторий ВГУ

токсикозе патологические изменения возникают также в печени, лимфоидной ткани, пищеварительном тракте. Для охратоксинов описано тератогенное действие, но канцерогенные эффекты пока не установлены.

Трихотеценовые микотоксины (около 40 веществ) продуцируются микроскопическими грибами рода *Fusarium* и по структуре относятся к сесквитерпенам (они содержат основное ядро из трех колец, названное трихотеканом). Эти токсины являются причиной наиболее широко распространенных микотоксикозов среди животных и человека (токсикоз «пьяного хлеба», акабаби-токсикоз, алиментарная токсическая алейкия). Патогенез поражений связан с ингибированием синтеза белков и поражения лизосомальных мембран. Грибы этого рода продуцируют также зеараленон (лактон резорциловой кислоты). Обладает гормоноподобным (эстрогенным) действием.

Микотоксин патулин продуцируется грибами рода *Penicillium* и по химическому строению является 4-гидроксифуропираном. Биологическое действие патулина проявляется как в виде острых токсикозов, так и в виде ярко выраженных канцерогенных и мутагенных эффектов. Считают, что данный микотоксин ингибирует ДНК-зависимую-РНК-полимеразу, т.е. процесс транскрипции. Этот же род грибов продуцирует целый ряд опасных для здоровья микотоксинов – лютеоскирин (ингибирование ферментов дыхательных путей), циклохлоротин (ингибирование ферментов углеводного и белкового обменов), цитреовиридин (нейротоксическое действие), цитринин (нефротоксическое действие).

4.3. *Токсины рыб* (около 400 видов) вызывают картину интоксикации, связанную с поражением пищеварительного тракта, нервной системы и смерть от поражения органов дыхания. Эти отравления связаны с потреблением рыб, живущих в южных морях (*ciguatera*). В пищевой цепочке, ведущей к отравлению человека, большое значение имеют морские бактерии и динофлагеляты. Динофлагеляты, поедаемые рыбами кораллового шельфа, вызывают у человека поражение нервной системы и параличи.

5. *Природные токсины некоторых продуктов питания.*

В природных пищевых продуктах могут присутствовать антивитамины, растительные фенолы, эстрогены, галлюциногены и другие вещества, наличие которых вредно для человека.

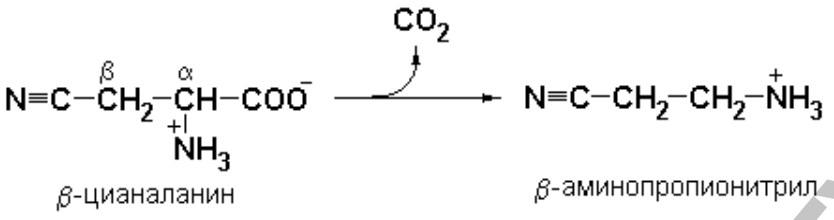
5.1. *Ингибиторы протеиназ* могут быть в составе бобовых, арахиса, картофеля и др. Ингибитор трипсина выделяют из сои. Цыплята, крысы и мыши, питающиеся соевым кормом, хуже растут, у них обнаружена гиперсекреция ферментов поджелудочной железой, нарушено образование и использование энергии. Возможно развитие аденомы и аденокарциномы поджелудочной железы.

5.2. Растительные белки, которые могут вызывать агглютинацию эритроцитов, называют *«фитогемаглютинин», «фитоаглютинины» и «лектины»*. При поступлении растительных агглютининов в организм находят инактивацию пепсина и других протеолитических ферментов. Фитогемаглютинин используется в лабораторной практике как индуктор бласттрансформации.

5.3. *Аминонитрилы.* Растения (*Lathyrus sativus, L. cicera, L. clymenum*) содержат химические вещества, способные вызывать заболевания нервной системы у людей, крупного рогатого скота и лошадей. Нейролатиризм характеризуется прогрессирующей мышечной слабостью, параличами конечностей и может заканчиваться смертельным исходом. Токсическими веществами, вызывающими данное заболевание, являются диаминобутират, диаминопропионат, оксалиламиноаланин и β-цианаланин. Кроме перечисленных соединений, вызывающих лати-

Репозиторий ВГУ

ризм к данному заболеванию имеет отношение также продукт декарбоксилирования β-цианаланина – β-аминопропионитрил:



У домашних птиц развивается остеолатиризм (проявления поражения соединительной ткани и костей).

5.4. *Пиролизидиновые алкалоиды* содержатся в 150 наиболее распространенных лекарственных растениях (зверобой, мать-и-мачеха, огуречник и др.). Водные и спиртовые экстракты их опасны, поскольку пиролизидиновые алкалоиды способны вызывать веноокклюзионные заболевания и цирротические изменения в печени. Имеются данные о роли таких алколоидов в канцерогенезе.

5.5. *Гоитрогены.* К гоитрогенам (веществам, ведущим к изменению функции щитовидной железы, гоитр – зоб) относят растения рода *Brassica* (капуста, цветная капуста, брокколи, кольраби), содержащие синигрин (аллилтиогликозид), глюкобрассицин (3-индолилметилтиогликозид), прогоитрин (2-гидрокси-3-бутенилтиогликозид), глюконапин (3-бутенилтиогликозид).

5.6. *Аллергены*. Пищевые антигены за счет взаимодействий с тучными клетками, циркулирующими базофилами, антиген-специфичными IgE могут привести к гиперчувствительности. Пищевые продукты (арахис, орехи, яйца, молоко, соя, рыба и другие морепродукты, бананы и цыплята) способны вызывать аллергическую реакцию немедленного типа у детей. Основные симптомы: атопическая экзема, астма и риниты.

5.7. *Оксалаты*. Оксалаты содержатся в овощах. Они представлены в растениях в виде растворимых калиевых и натриевых солей, или нерастворимых кальциевых солей. Надземная часть растений содержит много оксалатов. Нерастворимые кристаллы оксалата кальция легко обнаруживаются при микроскопии листьев растений. В растительной пище содержится 0,3 до 2,0% оксалатов на свежую ткань. Случаи острого отравления связаны с поражением пищеварительного тракта и ЦНС. При хроническом поступлении оксалатов возможно образование камней в мочевыводящих путях.

5.8. *Фитаты* (фосфатные производные миоинозитола) широко представлены в растительном мире. Фитаты пищи нарушают функционирование ряда микроэлементов, включая цинк. На первое место выходит картина дефицита цинка.

5.9. Выделяют группу природных (выполняют роль *фитогормонов* – ауксины, гиберрелины, цитокинины, абсциссовая кислота, эндогенный этилен и др.) и синтетических (производные арил- или арилоксиалифатических карбоновых кислот, индола, пиримидина, пиридазина, пирадола) *регуляторов роста растений*. Синтетические регуляторы роста растений, в отличие от природных, оказывают негативное влияние на организм человека как ксенобиотики.

Экзотические заболевания связаны с потреблением определенных орехов (*cycad*), стрессовых метаболитов растений (фитоалексины), вазоактивных аминов и др. [7, 9, 23, 25].

Репозиторий ВГУ

5.6. Проблемы экологической биохимии человека

Среди новых проблем, к решению которых имеет отношение экологическая биохимия, следует отметить ускорение старения населения за счет раннего развития атеросклероза, метаболическое действие радиоактивных загрязнений после аварии на Чернобыльской АЭС и широкое внедрение методов генетической инженерии (методов рекомбинантных ДНК).

Ускоренное старение сопряжено с поражением сосудов за счет избытка холестерола. Долгое время считалось, что воспроизведение атеросклеротических бляшек в аорте кроликов, кормленных холестеролом, явилось результатом холестероловой интоксикации организма. И лишь спустя 80 лет было установлено, что холестерол конечный продукт метаболизма органических молекул, эта молекула – предтеча желчных кислот, в виде которых углеродные скелеты метаболитов покидают организм. Но эта конечная молекула оказалась при определенных концентрациях токсичной для элементов сосудистой стенки, что и ведет к ее атеросклеротическому поражению.

Выделяют более двухсот факторов риска атеросклероза, среди которых видное место занимает нарушение питания, ведущее к гиперхолестеролемии, или воздействие ксенобиотиков, усиливающих образование холестерола или медленно обменивающихся белково-липидных комплексов, которые транспортируют холестерол (мелкие ЛПНП высокой плотности). До настоящего времени липидно-инфильтративная теория атеросклероза казалась наиболее доказанной.

В последние годы уделяется пристальное влияние эндотелию кровеносных сосудов, являющегося мишенью для многих ксенобиотиков и одновременно исходным пунктом начала развития атеросклеротического поражения сосуда. К развитию *дисфункции эндотелия* ведут наиболее распространенные патогенетические факторы и процессы: риск-факторы атеросклероза (гипертензия, курение, гиперхолестеролемия, сахарный диабет, мужской пол, возраст, атеросклероз у родственников), хронические инфекции (цитомегаловирус, вирусы герпеса, респираторные вирусы, *Helicobacter pylori*), факторы окружающей среды (гипоксия, ксенобиотики, оксиданты, излучения), генетические факторы (гомоцистеин, липопротеин (а), семейная гиперхолестеролемия, гипертриацилглицеролемия). Многие из этих факторов, а также сама дисфункция эндотелия ведут к активации эндотелия. Эндотелиальная дисфункция (снижение NO-продукции) и эндотелиальная активация (повышение продукции молекул адгезии) могут вызывать вазоконстрикцию, агрегацию тромбоцитов, пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов, адгезию лейкоцитов, окисление ЛПНП, активацию металлопротеиназ матрикса. Дисфункция эндотелия является наиболее ранним признаком атеросклероза при отсутствии ангиографических признаков заболевания. Имеется тесная связь между риск-факторами атеросклероза и дисфункцией эндотелия.

Окислительный стресс ведет к окислению ЛПНП, которые ингибируют освобождение NO в большей степени, чем нативные ЛПНП. Окисленные ЛПНП захватываются макрофагами через скавенджер-рецепторный механизм. Прооксидантные факторы и активные формы кислорода локализуются преимущественно в макрофагах и гладких мышечных клетках сосудов. Ксенобиотики (металлы) и гиперхолестеролемия стимулируют генерацию супероксидного анион-радикала ($O^{-\cdot}$) в гладкомышечных клетках, который затем окисляет ЛПНП. Супероксидный анион-радикал и перекись водорода активируют провоспалительные факторы транскрипции: ядерный фактор каппа-В (NF-κB), протеин активатор (AP)-1 и ранний

Репозиторий ВГУ

ростовой фактор ответа (egr)-1. Эти факторы способствуют экспрессии генов, кодирующих синтез клеточных молекул адгезии (VCAM-1), межклеточных молекул адгезии-1, Е-селектина, многих цитокинов и ростовых факторов (M-CSF). Эти данные позволяют ряду исследователей считать, что атеросклероз – воспалительный процесс, запускаемый окислительным стрессом, а окислительный стресс лежит в основе взаимодействия ксенобиотиков с организмом. Поэтому антиоксиданты (глутатион, α-токоферол, аскорбиновая кислота, супероксиддисмутаза, каталаза) препятствуют развитию атеросклероза, ингибируя активацию провоспалительных транскрипционных факторов. По нашему мнению, окислительный стресс может лежать в основе представлений о радиационно-экологических дислипопротеинемиях и радиационно-индуцированном атеросклерозе.

В последние годы *гомоцистеин* стал рассматриваться как важный риск-фактор атеросклероза. В 80 ретроспективных и проспективных клинических исследованиях за 10 лет показано, что повышение гомоцистеина в плазме крови ассоциируется с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний. Существует тесная связь между содержанием гомоцистеина и обеспеченностью витаминами – фолиевой кислотой, B_{12} и B_6. В плазме крови содержится 1% гомоцистеина, 5–10% гомоцистина, 80–90% связанного с белками гомоцистеина и 5–10% цистеина-гомоцистеина. Содержание общего гомоцистеина в плазме крови у здорового взрослого человека 5–15 мкмоль/л. Выделяют три типа гипергомоцистеинемии: легкую 15–25 мкмоль/л, среднюю 25–50 мкмоль/л и тяжелую 50–500 мкмоль/л. Гипергомоцистеинемия зависит от ряда факторов, включая прессинг ксенобиотиков: демографических (возраст, пол, этническая группа), генетических дефектов обмена метионина, недостаточности витаминов (фолиевая кислота, цианкобаламин, пиридоксол). Восстановленный гомоцистеин способен непосредственно повреждать функции клеток сосудов (эндотелий, гладкомышечные клетки) или опосредованно через образование активных метаболитов кислорода. По всей видимости, гомоцистеин играет важную роль на ранних стадиях атерогенеза. Лечение гипергомоцистеинемии базируется на гипотезе, согласно которой коррекция гомоцистеинового метаболизма (метилирование, трансметилирование) требует введения витаминов фолиевой кислоты, B_{12} и B_6.

При атеросклеротическом поражении целесообразно применять ксенобиотики-лекарства [7, 13, 25, 26]:

- классическую гиполипидемическую технологию, включающую сочетание диеты и лекарственной терапии;
- антиоксиданты, препятствующие развитию перекисной трансформации ЛПНП, а также факторы повышающие содержание и антиокислительный потенциал ЛПВП;
- противовоспалительные препараты – салицилаты и глюкокортикоиды, которые препятствуют активации NF-κB;
- фармакокоррекция функции эндотелия и усиление фиброзного покрытия атеросклеротической бляшки (ингибирование металлопротеназ матрикса);
- поддержание высокой концентрации NO (введение в коронарные сосуды предшественника оксида азота – аргинина; введение в коронарные сосуды женщин климактерического периода 17-β-эстрадиола, который усиливает освобождение NO эндотелием;
- снижение концентрации Lp(a) с помощью афереза, никотиновой кислоты, неомицина, анаболических стероидов (даназол, станозол), эстрогенов, ω-3-жирных кислот;
- коррекция гомоцистеинемии витаминами – фолиевая кислота, B_{12} и B_6.

Методы генетической инженерии *in vivo* и *in vitro* будут рассмотрены в главах 12 и 13.

Репозиторий ВГУ

Г Л А В А 6. **ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ КСЕНОБИОТИКОВ, МИКРОСОМАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ, КОНЪЮГАЦИЯ**

Метаболизм – это процесс биотрансформации поступившей молекулы ксенобиотика в один или более метаболитов. Метаболиты обычно более полярны и поэтому способны выделяться с мочой. Метаболизм ксенобиотиков происходит *в печени*, почках, а также в мышцах, некоторых других тканях и в крови. Как правило, метаболиты менее активны и менее токсичны, чем сами ксенобиотики. Однако, имеется группа ксенобиотиков-пролекарств, которые при метаболизме превращаются в активные лекарства. Следует упомянуть о возможности превращения неактивных проканцерогенов в активные канцерогены. Кроме того, при метаболизме ксенобиотиков могут возникать активные метаболиты. Эти особенности обязательно учитываются при мониторинге ксенобиотиков.

6.1. Роль печени в обезвреживании ксенобиотиков

Печень образует важнейший рубеж между внешней и внутренней средой, в связи с чем от ее состояния зависит характер взаимодействия организма с алиментарным (поступающим с пищей) ксенобиотиком. Масса печени составляет в среднем 22 г/кг массы тела; у человека с массой тела 70 кг масса печени – 1,5 кг. У человека печень имеет уникальное кровоснабжение: кровь *поступает по двум сосудам – артериальная по печеночной артерии* (20–30% получаемой печенью крови) и венозная – по воротной вене (70–80% получаемой печенью крови, несущей всосавшиеся в кишечнике вещества), а *оттекает по одному – печеночной вене*. В итоге клетки печени омывает смешанная кровь, несущая питательные вещества от кишечника и кислород из аорты.

Как хорошо известно, морфо-функциональной единицей печени является печеночная долька, в строении которой выделяют три зоны. В первой зоне дольки гепатоциты омываются притекающей кровью (прилежат к портальному тракту) и получают большее количество кислорода и питательных веществ в сравнении с гепатоцитами второй и особенно третьей зоны. Гепатоциты зоны 1 содержат больше митохондрий, и в них более интенсивно протекают энергетические процессы, включая бета-окисление жирных кислот, обмен аминокислот и синтеза мочевины, глюконеогенез. Перивенозные гепатоциты, омываемые оттекающей кровью (зона 3), содержат больше эндоплазматического ретикулума, и в них в большей мере сосредоточены процессы *окисления и конъюгации ксенобиотиков*. Однако в перивенозных гепатоцитах часто имеется дисбаланс между продукцией токсических метаболитов и их обезвреживанием. Поэтому в гепатоцитах третьей зо-

Репозиторий ВГУ

ны образуется большее количество реакционноспособных метаболитов ксенобиотиков и они хуже обезвреживаются.

Напомним основные типы клеток печени, которые принимают участие в реализации детоксикационной функции органа. В ткани печени на долю гепатоцитов приходится 72% от объема органа; 35% всех клеток (т.е. 8,1% объема органа) приходится на другие клетки, из которых на долю звездчатых ретикулоэндотелиоцитов (клетки Купфера) приходится 34%, на эндотелиальные клетки – 44%, на жировые клетки (клетки Ito)– 22% и Pit-клетки – до 5%.

Гепатоциты определяют основные функции печени. Продолжительность жизни гепатоцитов 200–400 суток. Высокий уровень организации метаболизма в гепатоците определяется многообразием его мембранных структур: мембраны шероховатого ретикулума – 35% (биосинтез белков), внутренние мембраны митохондрий – 32% (образование АТФ), *мембраны гладкого эндоплазматического ретикулума – 16% (метаболизм ксенобиотиков)*, мембраны аппарата Гольджи – 7% (пострибосомальная трансформация белков, шаперонинг), плазматическая мембрана – 2% (сигнальные и транспортные системы), лизосомальные, пероксисомальные и эндосомальные мембраны – по 0,4% (катаболизм молекул), ядерная мембрана – 0,2% (перенос субчастиц рибосом и РНК). В гепатоцитах зоны 1 (перипортальные) преобладает шероховатый эндоплазматический ретикулум (биосинтез экспортных белков), а в гепатоцитах зоны 3 (центрилобулярные) в большей степени представлен гладкий эндоплазматический ретикулум (микросомальное окисление).

Распределение метаболических процессов в структурных элементах гепатоцита: *ядро* – программа метаболизма клетки, апоптоз – запрограммированная гибель клеток, патология при генетических дефектах; *рибосомы*, шероховатый эндоплазматический ретикулум – синтез экспортных белков плазмы крови (кроме иммуноглобулинов), факторы свертывания крови, холинэстераза, лецитин-холестеролацилтрансфераза (ЛХАТ); *гладкий эндоплазматический ретикулум* – глюкозо-6-фосфатаза (освобождение глюкозы), биотрансформация и конъюгация метаболитов и ксенобиотиков; *цитозоль* – гликолиз, пентозофосфатный путь обмена углеводов, глюконеогенез, превращения моносахаридов, аминокислот, протеолиз, трансаминирование (АсАТ, 2/3); *митохондрии* – цикл трикарбоновых кислот, окислительное фосфорилирование (продукция АТФ), β-окисление жирных кислот, синтез мочевины, АсАТ (1/3); *лизосомы* – кислые гидролазы (фосфатаза, β-глюкуронидаза, рибонуклеаза, дезоксирибонуклеаза, α-гликозидазы, γ-амилаза и др.). В клетках ретикулоэндотелиальной системы осуществляется синтез иммуноглобулинов.

Маркерами гепатоцитов считают экспортный белок альбумин, цитохромы семейства Р-450, цитокератины 8 и 18, ферменты фруктозо-1-фосфатальдолаза, аргиназа, аланин-аминотрансфераза, α(альфа)-глутатион-S-трансфераза.

Гепатоциты отделены от синусоидов **эндотелиальными клетками**. Эти клетки имеют удлиненную форму, причем в уплощенной цитоплазме имеются скопления мелких пор (ситовидные пластинки) и крупные отверстия. Между эндотелиоцитами, составляющими до 50% от клеток, выстилающих синусоиды, имеются щели. Базальная мембрана отсутствует. Такая *фенестрация эндотелия позволяет плазме омывать микроворсинки гепатоцитов в пространстве Диссе. Фенестрация эндотелия лежит в основе алкогольного поражения печени за счет проникновения в гепатоциты липополисахаридных эндотоксинов кишечного происхождения.* В цитоплазме эндотелиальных клеток содержится много лизосом и пиноцитозных пузырьков. Клетки Купфера не вступают в контакт с перинуклеарной цитоплазмой эндотелиальных клеток. Они, как правило, располагаются между ними в

Репозиторий ВГУ

составе «стенки» синусоида. Способность эндотелиальных клеток к эндоцитозу ниже, чем у клеток Купфера. Наиболее известным маркером эндотелиальных клеток является фактор Виллебранда (фактор VIII системы свертывания крови).

До четверти клеток синусоидов представлены **клетками Купфера** (основная часть клеток ретикуло-эндотелиальной системы). Эти клетки представляют семейство мононуклеарных фагоцитов. В их цитоплазме много лизосом, пероксисом, включений пигментов и железосодержащих белков. Клетки Купфера поглощают из крови чужеродный материал, продукты распада клеток, избыток активированных факторов свертывания крови, иммунных комплексов и др. Они имеют большую поглотительную поверхность, располагаясь в щелях между эндотелиальными клетками или распластываясь на них. Многочисленные отростки клеток Купфера через фенестрированный эндотелий проникают в пространство Диссе. Эти клетки обновляются как за счет деления, так и из моноцитарных предшественников костномозгового происхождения. Средняя продолжительность жизни клеток Купфера около 100 дней.

Клетки Ito, запасающие жир, содержат витамин А и продуцируют волокнистые компоненты соединительной ткани междолькового пространства. На их долю приходится около 20–25% клеток синусоидов. Они расположены в пространстве Диссе и с помощью паукообразных отростков как бы охватывают синусоид, играя роль сфинктера, регулирующего внутрипеченочный кровоток. У человека в печени хранится 70–80% общего запаса витамина А, причем ¾ его запасов содержится в клетках Ito, и только ¼ – в гепатоцитах. Превращаясь в миофибробласты, клетки Ito теряют липоидные капли с запасами витамина А. Этот процесс происходит при фиброзных изменениях в печени. Считают, что любое повреждение печени запускает фиброгенную функцию клеток Ito, которые превращаются в коллагенпродуцирующие единицы (коллагены типов I, III, IV, гликопротеины – фибронектин, ламинин, нидоген/энтактин, тенасцин, гликозамингликаны и протеогликаны). Витамин А препятствует развитию фиброгенеза.

На ***Pit-клетки***, близкие к натуральным клеткам-киллерам, приходится около 5% клеток синусоидов. Они располагаются в просвете синусоида, прикрепляясь отростками к эндотелиоцитам, реже их можно обнаружить в пространстве Диссе. Pit-клетки содержат характерные гранулы с плотным центром, похожим на фруктовую косточку. Эти клетки контактируют с клетками Купфера и гепатоцитами. Все непаренхиматозные клетки участвуют в продукции факторов, контролирующих регенерацию печени (эпидермальный ростовой фактор, трансформирующий ростовой фактор-α и фактор роста гепатоцитов) [25, 26].

6.2. Метаболизм ксенобиотиков

Метаболизм ксенобиотиков происходит в две фазы.

Первая фаза – это *специфическая перестройка молекулы* ксенобиотика с введением определенных функциональных групп, которые обусловливают увеличение *гидрофильности вещества*. Вторая фаза – это *конъюгация* образовавшихся метаболитов с эндогенными веществами для транспорта и выведения. Иногда метаболизируемые препараты сразу вступают в реакцию конъюгации.

Биотрансформация лекарств ведет к их инактивации в первой фазе.

Репозиторий ВГУ

6.2.1. Первая фаза метаболизма ксенобиотиков

Гидроксилирование ксенобиотиков является наиболее важной реакцией первой фазы их метаболизма. Процесс первой фазы детоксикации (инактивации) ксенобиотиков получил название *микросомального окисления*. Этот процесс зависит от функционирования *гидроксилазной мультиферментной системы* микросом печени, содержащей в качестве терминальной оксидазы цитохром Р-450, который обладает *свойствами монооксигеназы* (или *оксидазы со смешанной функцией*).

Под термином цитохром Р-450 подразумевается не один фермент, а целое *суперсемейство изоферментов с перекрывающейся субстратной специфичностью*. Каждая изоформа имеет специфический спектр метаболизируемых субстратов. Однако при этом одно и то же соединение может метаболизироваться различными изоформами цитохрома Р-450 с образованием как одинаковых, так и различающихся продуктов. В зависимости от преобладания в клетке той или иной изоформы может меняться и состав продуктов реакции, в частности, соотношение продуктов активации и детоксикации.

Общепринятой является следующая классификация. Цитохромы Р-450 делят на семейства, при этом формы одного семейства имеют около 40% подобия аминокислотного состава. Семейства подразделяют на подсемейства, члены которых должны обладать как минимум 65% подобия аминокислотного состава. В соответствии с классификацией цитохромы Р-450 обозначаются аббревиатурой CYP. В названии формы первая цифра после аббревиатуры означает номер семейства. Буква после цифры характеризует подсемейство (A, B, C и т.д.). Например – CYP3A, CYP5C. Ещё одна цифра означает индивидуальный ген. Таким образом, «полное имя» для некоторых из наиболее важных в клиническом отношении изоформ выглядит как CYP3A4 или CYP2D6. Цитохром Р-450 3А4 (CYP3A4) эндоплазматического ретикулума клеток печени человека способен метаболизировать не менее 50% лекарственных веществ, находящихся в настоящее время на фармацевтическом рынке. Цитохром Р-450 2Е1 (CYP2E1) метаболизирует малые молекулы эндогенного и экзогенного происхождения (этанол, ацетон, четыреххлористый углерод, нитрозамины, галотан и др.). Экспрессия мРНК и белка CYP2E1 в клетках печени увеличивается при голодании, диабете, высокожировой диете, ожирении, алкогольной интоксикации. CYP2E1 генерирует существенные количества активных форм кислорода, в связи с чем играет важную роль в патогенезе алкогольных и неалкогольных заболеваний печени.

Разные цитохромы Р-450 обладают весьма широкой субстратной специфичностью. Кроме реакций гидроксилирования они способны катализировать реакции N-, S-, O-дезалкилирования, эпоксидирования, оксигенирования гетероатома, окислительного расщепления

Репозиторий ВГУ

эфирной и амидной связей, пероксидного окисления, изомеризации, десатурации и др.

Общая схема функционирования микросомальной мультиферментной системы печени с цитохромом Р-450 в качестве терминальной оксидазы включает следующие стадии (рис. 6.1):

– на первой стадии процесса происходит взаимодействие субстрата и цитохрома Р-450 с образованием двойного фермент-субстратного комплекса (при этом взаимодействие цитохрома Р-450 с субстратом той или иной природы сопровождается появлением соответствующих спектральных изменений, характеризующих природу субстрата);
– на второй стадии образовавшийся двойной фермент-субстратный комплекс восстанавливается первым электроном, источником которого является НАДФН, а непосредственным донором электрона для цитохрома Р-450 – НАДФН-цитохром Р-450-редуктаза. При этом происходит переход ферри-(Fe^{+3})-формы цитохрома Р-450 в ферро-(Fe^{+2})-форму;
– восстановление двойного комплекса первым электроном создает условия для взаимодействия двойного фермент-субстратного комплекса с молекулой кислорода с образованием тройного комплекса – Р-450-S-O_2;
– восстановление образовавшегося тройного комплекса вторым электроном, донором которого является электрон-транспортная цепь, включающая НАДН, НАДН-цитохром b_5-редуктазу и цитохром b_5, приводит к активации молекулярного кислорода. При этом один атом внедряется в молекулу субстрата, а второй образует воду.

Следует добавить, что НАДФН-цитохром Р-450-редуктаза, являющаяся флавопротеидом, содержит две флавиновые группировки: ФАД принимает электроны от НАДФН, а ФМН ответственен за восстановление цитохрома Р-450.

Процесс микросомального гидроксилирования можно представить следующим уравнением:

$$RH + НАДФН + H^+ + O_2 \rightarrow ROH + НАДФ^+ + H_2O,$$

где RH – окисляемый субстрат.

Следует отметить, что окисление органических соединений в микросомальных монооксигеназных реакциях в отличие от реакций митохондриального окисления, как правило, не решает никаких энергетических задач, а *выполняет защитную (детоксикационную)* и пластическую функции. Окисленные продукты могут быть использованы в качестве пластического материала или сразу же удаляются из организма.

Репозиторий ВГУ

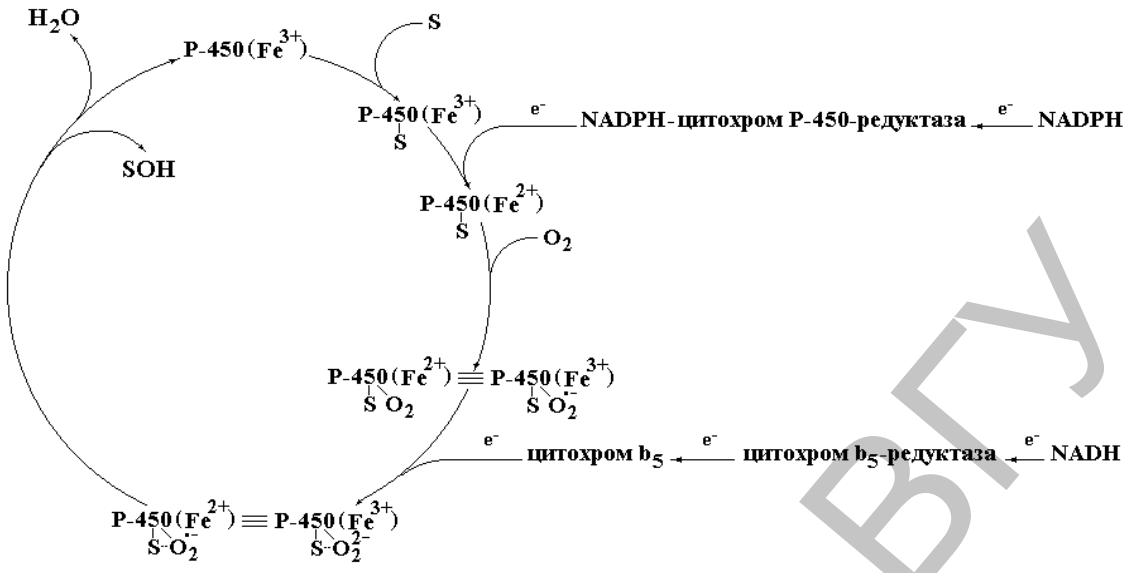


Рис. 6.1. **Микросомальное окисление.**

В митохондриях содержится монооксигеназная система, локализованная на внутренней стороне внутренней мембраны митохондрий, которая выполняет биосинтетическую функцию, т.е. введение ОН-групп при биосинтезе стероидных гормонов (кора надпочечников, семенники, яичники, плацента). В митохондриях надпочечников присутствует особая форма цитохрома Р-450 – Р-450_{SCC}, которая осуществляет отщепление боковой цепи (side-chain cleavage) в молекуле холестерола с превращением последнего в прегненолон.

В процессе метаболизма возможны изменения специфической активности и токсичности ксенобиотиков:

1. Появление токсичности (синтез «летальных» молекул) – фторацетат превращается в фторцитрат, блокирующий аконитатгидратазу ЦТК.

2. Усиление токсичности – О-деалкилирование фенацетина ведет к образованию парацетамола.

3. Потеря биологической активности – фенобарбитал при гидроксилировании превращается в неактивный метаболит параоксифенил – этилбарбитуровую кислоту.

4. Появление биологической активности – фталазол гидролизуется в организме с образованием активного норсульфазола.

5. Изменение биологической активности – антидепрессант ипрониазид при дезалкилировании превращается в противотуберкулезный препарат изониазид.

6. Усиление биологической активности: усиление антидепрессивной активности имипрамина при его деметилировании в дезмети-

Репозиторий ВГУ

лимипрамин; деметилирование противокашлевого препарата кодеина ведет к образованию наркотического вещества морфина.

Кроме того возможны еще 3 типа ферментативных реакций:

1. Реакции окисления катализируют также диоксигеназы (расщепление ароматических колец ксенобиотиков). Процесс происходит путем включения двух атомов кислорода в молекулу субстрата $R + O_2 \rightarrow RO_2$. Этот путь служит для превращения молекул, содержащих ароматические кольца, например, гомогентизиновую кислоту. Одной из биологически важных диоксигеназных реакций является разделение молекулы β-каротина на 2 молекулы ретиналя (одна из форм витамина А).

2. Реакции восстановления – ферментативное превращение ароматических нитро- и азосоединений в амины.

3. Реакции гидролиза – ферменты эстеразы (например, гидролиз ипрониазида на никотиновую кислоту и изопропил-гидразин).

В митохондриях есть простые ФАД- и ФМН-содержащие системы превращения аминов, альдегидов, спиртов [13, 16, 26].

6.2.2. Реакции конъюгации метаболитов ксенобиотиков

Вторая фаза биотрансформации – конъюгация – включает реакции двух типов. 1 тип реакций – активируется конъюгирующее вещество, которое затем взаимодействует с ксенобиотиком. Происходит во всех тканях. 2 тип реакций – активируется ксенобиотик, который взаимодействует с конъюгирующим веществом. Происходит в печени и почках. Встречается редко.

Первый тип реакций конъюгации:

1. Конъюгация с *глюкуроновой кислотой*; источником остатков глюкуроновой кислоты является УДФ-глюкуроновая кислота. Глюкуронидной конъюгации подвергаются природные соединения (билирубин, стероидные гормоны и др.), ксенобиотики (фенолы, стероиды, ароматические амины и др.). В реакцию вступают субстраты, которые имеют гидроксильную, карбоксильную или аминогруппу. Ферменты – УДФ-глюкуронилтрансферазы, локализованы в эндоплазматической сети клеток печени, в меньшей степени в почках, пищеварительном тракте, коже. RXH + УДФ-глюкуронат → RX-глюкуронид + УДФ.

2. Сульфатная конъюгация; активной формой серной кислоты является *3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат (ФАФС)*. Сульфатной конъюгации подвергаются эндогенные токсические продукты гниения белков в кишечнике (индол, скатол, фенолы), а также стероиды, иодтиронины, токоферолы, нафтохиноны и др. Как правило, вещества должны быть циклическими соединениями, имеющими свободные аминные или

Репозиторий ВГУ

гидроксильные группы. Происходит в основном в печени. Ферменты – сульфотрансферазы. $RXH + ФАФ{\sim}SO_3H \rightarrow RX\text{-}SO_3H + ФАФ$.

3. Ацетильная конъюгация. Происходит в печени, а также в слизистой пищеварительного тракта и в ретикулоэндотелиальных клетках селезенки и легких. Источник ацетильных групп – *ацетил-КоА*. Ферменты – ацетилтрансферазы. Этому типу конъюгации подвергаются вещества, имеющие свободную аминогруппу (серотонин, гистамин, сульфаниламиды, гидразиды изоникотиновой кислоты и др.) $R\text{-}NH_2$ + ацетил-КоА $\rightarrow R\text{-}NH\text{-}CO\text{-}CH_3$ + HS-КоА.

4. Метильная конъюгация; источником метильных групп является *S-аденозилметионин*, ферменты – метилтрансферазы. Метильной конъюгации подвергаются фенолы, амины, тиоловые соединения. Образуются соответственно O-, N- и S-метиловые конъюгаты. Процесс наиболее интенсивен в печени.

$$R\text{-}OH + CH_3\text{-}S\text{-}AM \rightarrow R\text{-}O\text{-}CH_3 + S\text{-}ГЦ.$$

5. Тиосульфатная конъюгация используется при обезвреживании цианидов. Конъюгирующим веществом является *сера тиосульфата*. Источником тиосульфата в тканях являются серосодержащие аминокислоты. Конъюгация происходит с цианидами неорганического (синильная кислота, цианиды натрия, калия) и органического (ацетонитрил, акрилонитрил, бензилцианид и др.) происхождения.

6. Конъюгация с *глутатионом*. Подвергаются алифатические и ароматические соединения. Протекает в печени и почках. Глутатион-S-трансферазы – основные ферменты ксенобиотик-обезвреживающих систем печени. Глютатион-S-трансферазная реакция важна для нейтрализации нестабильных электрофильных молекул. Микросомальная глютатион-S-трансфераза печени сопряжена с цитохром P-450-системой, что служит для быстрой инактивации активных метаболитов, образуемых при метаболизме ксенобиотиков. Глютатион содержится в высокой концентрации в печени (до 5 ммоль/л): 90% глютатиона содержится в цитозоле и около 10% – в митохондриях. В митохондриях глютатион является антиоксидантом, восстанавливает перекись водорода и предупреждает пероксидацию липидов гидроксильным радикалом. При низкой концентрации глютатиона в клетке повышается ее чувствительность к свободно-радикальному повреждению. Цистеин для глютатиона в печени получается в процессе превращений метионина и серина, а в других тканях – преимущественно в процессе распада глютатиона. Классическая ацетаминофеновая интоксикация индуцирует истощение резервов митохондриального глю-

Репозиторий ВГУ

татиона. Для предотвращения этого эффекта целесообразно назначение экзогенного цистеина в виде N-ацетилцистеина.

Второй тип реакций обезвреживания включает реакции конъюгации с аминокислотами. Предварительно происходит активация ксенобиотика (ароматических и гетероциклических карбоновых кислот). Глициновые конъюгаты обозначают как «гиппуровые» кислоты. Бензойная кислота + АТФ + HS-КоА → бензоил-S-КоА [7, 13, 26].

6.2.3. Элиминация ксенобиотиков

Элиминация – выведение ксенобиотика или его метаболитов из организма. Имеются два основных пути: с мочой через почки и с желчью через печень. Возможны и другие пути: через кожу (пот, кожное сало), легкие (выдыхаемый воздух), молочные железы (молоко), слюнные железы (слюна). Ксенобиотики выводятся из организма: 1) в неизменном виде; 2) в виде метаболитов; 3) в виде конъюгатов; 4) в комплексе с биомолекулами.

Элиминационное время полужизни – это время, которое требуется для уменьшения концентрации ксенобиотика (например, лекарства) на 50%. Обычно требуется 7 элиминационных времен полужизни для выведения 99% лекарства и 10 элиминационных времен полужизни для выведения 99,9% лекарства [13].

6.3. Химическое повреждение печени

Печень – основной орган обезвреживания ксенобиотиков. В то же время печень как орган является важнейшей мишенью действия ксенобиотиков.

Известно достаточно большое количество веществ – детергентов, разобщителей окислительного фосфорилирования и свободного дыхания, канцерогенов, лекарств и других ксенобиотиков, способных индуцировать разрыв двухцепочечной молекулы ДНК в гепатоцитах и тем самым вести к гибели клеток: сульфат кадмия, диметил сульфат, N-метил-N′-нитро-N-нитрозогуанидин, 2-аминобифенил, диэтилстильбестрол, менадион, ацетаминофен, додецилсульфат натрия, фенформин HCl, D-ментол, фталевый ангидрид, тетрациклин солянокислый, 2,4-дихлорофенол, *р*-нитрофенол, литохолевая кислота, фенилтиокарбамид, гидразин сульфат. Химическое повреждение печени могут вызывать природные вещества и ксенобиотики, включая фармацевтические препараты. На последние приходится до 25% всех случаев острого повреждения печени. Гепатоциты функционируют в условиях высоких концентраций реактивных и токсических форм лекарственных препаратов. Последние могут быть токсичными в нативной форме или таковыми становятся в процессе их метаболизма. В метаболизме различных ксенобиотиков участвуют разные изоформы цитохрома Р-450. *Выделяют два фонда цитохрома Р-450: первый вовлечен в метаболизм эндогенных веществ, а второй индуцируется экзогенными ксенобиотиками.* Процессы конъюгации катализируют чаще всего УДФ-глюкуронилтрансфераза, сульфотрансфераза, глюта-

Репозиторий ВГУ

тион-S-трансферазы. Глюкуронидация является основным видом конъюгации при детоксикации веществ. Сульфатация, как правило, обеспечивает снижение токсичности и ускорение клиренса ксенобиотиков. Метаболизм ксенобиотиков локализован не только в гепатоцитах, но также в синусоидальных эндотелиальных клетках, способных к превращениям ксенобиотиков. Ряд ксенобиотиков-лекарств проявляет селективную токсичность по отношению к этим клеткам по сравнению с гепатоцитами. Эта селективность связана с более слабыми защитными механизмами синусоидальных эндотелиальных клеток к действию ксенобиотиков.

Выделяют понятие *прямой цитотоксичности* химических веществ, согласно которому гепатотоксические метаболиты, связываясь с «критическими молекулами», могут повреждать клетки печени. К ним относят электрофильные метаболиты (ковалентно связываются с белками) и свободные радикалы (включают перекисное окисление липидов или окисляют сульфгидрильные группы белков).

В настоящее время известны 5 основных механизмов, ведущих к гибели клеток: 1) повреждения плазматической мембраны и нарушения цитоскелета (blebbing); 2) дисфункция митохондрий; 3) утрата внутриклеточного ионного гомеостаза; 4) активация ферментов деградации веществ; 5) окислительный стресс в результате несоответствия прооксидантных и антиаксидантных ресурсов клетки [7].

6.4. Ферменты кишечной микрофлоры

При участии кишечной флоры также возможен метаболизм химических соединений. Действие бактериальных ферментов сопровождается расщеплением продуктов второй фазы метаболизма (поступающих в кишечник с желчью) и образованием исходных метаболитов. Этот процесс проходит при участии гидролаз, разрушающих глюкурониды и сульфаты. Реабсорбция образовавшихся веществ замыкает цикл внутрипеченочной рециркуляции ксенобиотиков. Кроме того, анаэробная среда кишечника обеспечивает возможность восстановления некоторых химических веществ бактериями, например, восстановление нитроароматических соединений сопровождается образованием аминов, которые, поступая в печень, вновь подвергаются метаболизму. Бактериальная β-глюкуронидаза и нитроредуктаза играют исключительно важную роль в процессе многоэтапной биоактивации канцерогена 2,4-динитротолуола.

6.5. Факторы, влияющие на метаболизм ксенобиотиков

Основные факторы, влияющие на метаболизм ксенобиотиков приведены в табл. 6.1.

Репозиторий ВГУ

Таблица 6.1 – Факторы, влияющие на метаболизм ксенобиотиков [7]

Группа факторов	Тип факторов
Естественные факторы	Вид, пол, возраст, питание
Индукторы ферментов	Барбитураты, полициклические углеводороды, андрогенные стероиды, анаболические стероиды, глюкокортикоиды и др.
Ингибиторы ферментов	Метирапон, 7,8-бензофлавон, кобальт, SKF-525 и др.
Повреждения структуры органа	Хлорированные углеводороды, тироксин, аллоксан, морфин, адреналэктомия, кастрация самцов, голод

1. Генетические факторы: генетические особенности распределения семейства цитохрома Р-450, наличие различий в ферментах ацетилирования (слабые, сильные ацетиляторы) и др.

2. Пол и возраст. У молодых и старых особей нарушены синтез и клиренс ферментов обезвреживания ксенобиотиков. У мужчин и женщин отличаются системы транспорта гидрофобных веществ в связи с особенностями синтеза фосфолипидов и др.

3. Влияние химических веществ. Выделяют три группы веществ, поразному влияющих на метаболизм ксенобиотиков:

3.1. Практически не влияют на активность и количество ферментов метаболизма ксенобиотиков.

3.2. Повышают активность и количество ферментов метаболизма ксенобиотиков – *индукторы*; индукторы, как правило, жирорастворимые вещества, их действие проявляется при повторном поступлении и они неспецифичны; самым сильным индуктором монооксигеназ является 2,3,7,8-тетрахлордибензо-р-диоксин (ТХДД) – его эффективная доза 1 мкг/кг; для других ксенобитиков эта доза 10 мг/кг массы тела. Фенобарбитал вызывает выраженную пролиферацию гладкого эндоплазматического ретикулума в гепатоцитах и увеличение активности цитохромов Р-450. В результате нарастает мощность деметилирования ксенобиотиков (нитроанизол). Гидроксилирование активируют барбитураты, а эпоксидирование – альдрин. Индукция, вызываемая полициклическими углеводородами, не сопровождается пролиферацией гладкого эндоплазматического ретикулума. Но при этом существенно возрастает активность Р-450, УДФ-глюкуронилтрансферазы, гидроксилаз. Усиление метаболизма ксенобиотиков приводит обычно к снижению их токсичности.

3.3. Угнетают активность ферментов метаболизма ксенобиотиков – *ингибиторы.* К ним относят следующие группы веществ:

– конкурентные ингибиторы ферментов (этиловый спирт конкурентный ингибитор ферментов метаболизма метанола или этиленгликоля);

– неконкурентные ингибиторы – алкилирующие агенты, угнетающие активность фермента неконкурентным путем;

Репозиторий ВГУ

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

– реакционноспособные промежуточные метаболиты, ингибирующие активность ферментов нескольких типов в месте их образования (метаболиты четыреххлористого углерода, дихлорэтана и др.);

– ингибиторы синтеза кофакторов и простетических групп.

Если ксенобиотик подвергается в организме детоксикации, угнетение его метаболизма приведет к повышению токсичности, если же происходит биоактивация, токсичность вещества понижатся. Например, дисульфирам (антабус), являясь ингибитором альдегиддегидрогеназы, вызывает резкое повышение содержания ацетальдегида в крови и тканях человека, принявшего этанол. Это сопровождается тошнотой, рвотой и другими тягостными симптомами. На этом эффекте основано лечение алкоголизма. Похожая ситуация бывает при отравлении грибами рода *Coprinus*. Через 3–6 часов после их приема развивается повышенная чувствительность к алкоголю, продлжающаяся до 3 суток. После приема алкоголя в течение 20 мин – 2 часов появляются тошнота, рвота, покраснение кожных покровов, головная боль, тахикардия, снижение артериального давления. В тяжелых случаях – потеря сознания. Оказывается, в этих грибах содержится термостабильный токсин – протокоприн. В организме вещество превращается в коприн – мощный ингибитор альдегиддегидрогеназы.

Коканцерогенное действие ряда ксенобиотиков обусловлено их способностью угнетать процессы детоксикации канцерогенов. Так, пиперонилбутоксид (ингибитор Р-450) является коканцерогеном фреонов 112 и 113.

Для ряда ксенобиотиков характерен *двухфазный эффект, включающий угнетение и индукцию.* Ингибирующее действие ксенобиотиков, как правило, процесс быстрый, состоящий в прямом взаимодействии ксенобиотика с ферментом. Индукция – пролонгированный процесс. В этой связи нередко после действия вещества наблюдается период кратковременного снижения активности монооксигеназ, сменяющийся периодом относительно стойкого повышения их активности. Наиболее известным веществом с двухфазной фармакодинамикой – пиперонилбутоксид [7, 26].

Репозиторий ВГУ

Г Л А В А 7. ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ У ПРОКАРИОТ, ГРИБОВ И ВОДОРОСЛЕЙ

В последнее время в связи с развитием биотехнологии сохраняется устойчивый интерес к прокариотическим и эукариотическим клеткам (прежде всего к грибам и низшим растениям) как потенциальным продуцентам биологически активных веществ.

Экологическая биохимия прокариот, грибов и водорослей определяется следующими причинами:

1. Практически все прокариоты и многие низшие растения обитают в водной среде.

2. При их половом размножении необходим поиск одной клеткой (гаметой) другой клетки (гаметы).

3. Многие прокариоты и грибы паразитируют на эукариотах и в качестве основного/единственного средства агрессии или защиты используют биохимические процессы.

4. Биохимические взаимодействия прокариот и низших растений с другими организмами обеспечивают адаптивную реакцию прокариот, грибов и водорослей, что обеспечивает рост общего числа видов в этих группах [9].

7.1. Биохимическая экология прокариот в сопоставлении с эукариотами

В данном разделе рассматриваются нетрофические взаимодействия, т.е. отношения организмов, которые не сводятся к переносу энергии и пищевых субстратов от одного трофического уровня к другому.

Известны некоторые общие *внутривидовые* биохимические взаимодействия у прокариот и эукариот, например:

1. *Половые феромоны* у *Streptococcus faecalis* представлены несколькими линейными пептидами. Каждому феромону соответствует определенная плазмида в клетках, воспринимающих данный феромон как сигнал для синтеза белка, способствующего слипанию клетки-продуцента феромона и клетки носителя плазмиды. В результате слипания клеток (conjugation, mating) клетки-носители плазмиды передают копии своих плазмид клеткам-продуцентам феромона. Половые феромоны также имеются у многих эукариот – грибов, водорослей, разных типов животных.

2. *Ауторегуляторы* (регулятор образуется в клетке для регуляции биохимических процессов в ней же) у стрептомицетов действуют на дифференцировку клеток, спорообразование и синтез антибиоти-

Репозиторий ВГУ

ков. В клетках грибов *Candida albicans* вырабатывается вещество MARS (morphogenic autoregulatory substance), которое подавляет переход от дрожжеподобных клеток к мицелиальным. У высших млекопитающих существует аутокринная регуляция метаболизма.

3. *Токсины.* У прокариот возможно образование *бактериоцинов* – белков, токсичных для других штаммов этого же вида, лишенных возможности синтезировать бактериоцины из-за отсутствия соответствующих плазмид. У дрожжей *Kluyveromyces lactis имеются штаммы-убийцы,* продуцирующие по программе плазмиды k1 (8,9 kb) белковый токсин, состоящий из трех субъединиц. Для одновременной продукции токсина и факторов иммунитета к нему в клетке должна присутствовать и функционировать плазмида k2 (13,4 kb). Этот токсин действует на другие штаммы дрожжей, включая *Saccharomyces cerevisiae.*

4. *Межвидовые* взаимодействия у прокариот включают две основные группы биохимических процессов:

1) опосредуемые летучими метаболитами (почвенные микроорганизмы – бактерии и грибы);

2) опосредуемые водорастворимыми метаболитами (как почвенные, так и водные микроорганизмы).

Рассмотрим наиболее общие биохимические процессы при межвидовых взаимодействиях.

4.1. *Ингибирование*. И прокариоты, и эукариоты (грибы) способны продуцировать *антибиотики* (с антибактериальным или антифунгальным действием), *аллелопатические вещества* водорослей и высших растений (аналоги антибиотиков прокариот), *ингибиторы ферментов* (прокариоты и грибы).

4.2. Эффект *стимулирования продукции биологически активных веществ* обнаружен в бинарных культурах, когда микроорганизмы одного вида продуцируют БАВ, используемые микроорганизмом другого вида. Такой эффект прослеживается на бинарных культурах прокариот (например, *Streptomyces rimosus* + *Str. violaceus*), эукариот (например, *Aspergillus kanagawaensis* + *Asp. wentii*), а также прокариот и эукариот.

4.3. Эффект *стимулирования роста* достигается метаболитами как прокариот, так и эукариот. Так, декапептид из дрожжей, включающий остатки аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, глицина и лизина, способен стимулировать рост *Lactobacillus sanfrancisco.* В бинарной культуре дрожжей клетки *Candida mycoderma* продуцируют биотин, необходимый для роста клеток *Candida tropicalis.*

4.4. *Симбиоз и синтрофия* регистрируются как между прокариотами, так и прокариотами и эукариотами. Это явление основано на обмене метаболитами между клетками-симбионтами. Например, *Mucor ramanianus* обеспечивает синтез пиримидина, а *Rhodotorula rubra* – син-

Репозиторий ВГУ

тез тиазола. У высших млекопитающих микрофлора пищеварительного тракта обеспечивает образование ряда незаменимых компонентов пищи (витамин Н, B_6 и др.), необходимых для клеток макроорганизма.

Доказано, что бактерии и грибы продуцируют широкий набор летучих веществ, способных ингибировать рост, спорообразование и прорастание спор грибов, но не доказано их влияние на жизнедеятельность прокариот.

5. *Аттрактанты и репелленты.* Ориентация и передвижение прокариот в водной среде регулируются химическими веществами, воспринимаемыми MCP (methyl-accepting chemotaxis proteins). Например, для *Escherichia coli* идентифицировано несколько MCP, которые подвергаются метилированию или деметилированию остатков глутамата: 1) Tsr-белок (аттрактанты – серин и родственные аминокислоты, репелленты – ацетат, индол и лейцин); 2) Tar-белок (аттрактанты – L-аспартат и мальтоза, репелленты – ионы никеля и кобальта); 3) Trg-белок (аттрактанты – рибоза и галактоза); 4) Tap-белок (аттрактанты – дипептиды). Молекулярные механизмы рецепции аттрактантов и репеллентов у эукариот имеют существенные отличия.

6. *Сидерофоры* – вещества у прокариот и грибов, способные связывать железо (феррихром, родоторуловая кислота, ферроксиамины, фузаринины, шизокины, фитосидерофоры и др.). Сидерофоры воздействуют на растения следующим образом:

6.1. Наряду с антибиотиками могут влиять на рост конкурентных микроорганизмов и тем самым участвовать в регуляции состава корневой микрофлоры и роста растений.

6.2. Путем связывания железа способствуют транспорту его в растения, что улучшает минеральное питание растения.

6.3. Могут участвовать в активизации вирулентности бактерий, содействуя появлению их патогенности по отношению к растениям.

7. *Образование сообществ, предпочитающих определенные субстраты, метаболиты или биохимические процессы.*

7.1. Известны сообщества прокариот и грибов, обеспечивающих разложение органических веществ, загрязняющих окружающую среду (n-алканы, 3,4-дихлорпропионанилид и др.). Например, алкилбензолсульфонаты разлагаются четырехчленным сообществом *Pseudomonas putida* + *P. alcaligenes* + *Arthrobacter globiformis* + *Serratia marcescens.*

7.2. Взаимодействие между бактериями и растениями, например, между *Rhizobium spp.* и бобовыми с помощью хемомедиаторов лютеолина и 7,4′-диоксифлавона), между *Agrobacterium tumefacienc* и некоторыми растениями с помощью хемимедиаторов ацетосирингона и α-оксиацетосирингона.

7.3. В водных экосистемах – продуцирование водорослями многочисленных антибактериальных соединений, а в наземных экосисте-

Репозиторий ВГУ

мах – ингибирование нитрифицирующих бактерий веществами некоторых растений.

7.4. Стимулирование образования биологически активных соединений в рамках аменсальных взаимоотношений, например, стимуляция синтеза леворина *Str. levoris* в присутствии грибов *Candida spp.*

Итак, можно констатировать множество аналогий в биохимической экологии прокариот и эукариот. Вместе с тем биохимические механизмы, формирующие экологические особенности прокариот, зачастую отличаются от таковых у эукариот при достижения идентичных экологически универсальных целей [9, 21].

7.2. Биохимические взаимодействия между грибами и водорослями (роль экзометаболитов)

Особенностью взаимодействий между грибами и водорослями является выделение метаболитов в увлажненную или водную внешнюю среду.

Внутривидовые взаимодействия грибов и водорослей включают следующие биохимические процессы:

1. Для привлечения к слиянию двух гаплоидных клеток грибов и водорослей служат *половые феромоны, мейтинг-феромоны или просто аттрактанты.* Например, женские гаметы гриба *Allomyces* (из класса *Chytridiomycetes*) выделяют половой аттрактант для мужских гамет – сиренин ($C_{15}H_{24}O_2$), эффективный в концентрации 10^{-10} моль/л, а конъюгация гаплоидных клеток у дрожжей рода *Rhodosporidium* требует S-фарнезил-ундекапептида. У мукоровых грибов функции половых аттрактантов выполняют метил-4-дигидротриспораты и метилтриспораты. Для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* процесс слияния гаплоидных клеток требует экспрессии STE-генов и взаимодействия специальных гликопротеинов поверхности клеток.

Зрелые женские гаметы ламинариевых водорослей выделяют феромоны, например, ламоксирен, которые вызывают высвобождение сперматозоидов из созревших антеридиев (специальных половых органов), а также служат аттрактантом для сперматозоидов. Порог чувствительности андрогамет бурых водорослей весьма низок: для андрогамет *Ectocarpus siliculosus* порог чувствительности к эктокарпену $0{,}9–9{,}0^{-9}$ моль/л. Для водорослей характерна относительно низкая специфичность феромонов. Считают, что воздействия феромонов, продуцируемых одним видом, на андрогаметы другого вида могут выполнять функцию химического нарушения репродукции другого вида, т.е. функцию химического оружия и химической борьбы за те или иные ресурсы среды.

2. Хемоаттрактанты, выделяемые во внешнюю среду, играют важную роль в онтогенезе. Особенно хорошо такое действие изучено на примере слизевиков. Так, в онтогенезе диктиостелиума (*Dictyoste-*

Репозиторий ВГУ

lium) есть переход от одноклеточной амебоидной стадии к стадии многоклеточных псевдоплазмодиев, при котором клетки агрегируют в один псевдоплазмодий. Этот процесс регулируется выделяемым клетками во внешнюю среду циклическим АМФ (цАМФ). В мембранах клеток найден рецептор, взаимодействующий с цАМФ в концентрациях порядка 10^{-6}–10^{-7} моль/л. В процессе рецепции для хемотаксиса диктиостелиума требуется также фолиевая кислота. Считают, что такой переход от одноклеточной стадии к многоклеточной может рассматриваться как модель эволюционного перехода от одноклеточности (цАМФ – межклеточный хемоаттрактант) к многоклеточности (цАМФ – внутриклеточный посредник действия сигнальных молекул).

3. *Аутоингибирование фитопланктона.* При выращивании некоторых фитопланктонных водорослей обнаружено, что добавление в культуральную среду фильтрата старой культуры той же водоросли подавляет рост изучаемой культуры. Оказалось, что в культуральной жидкости накапливаются вещества-аутоингибиторы, которые подавляют рост водоросли-продуцента этих веществ. Такое действие аутотоксичных веществ может рассматриваться как один из простейших примеров саморегуляции популяции; благодаря такой саморегуляции популяция избегает экспоненциального (или вообще неограниченного) роста, который был бы катастрофичным в условиях ограниченности ресурсов среды или ограниченной экологической емкости местообитания.

Межвидовые взаимодействия целесообразно рассмотреть на следующих примерах:

4. *Взаимодействие разных видов и штаммов фитопланктона* было исследовано в классических экспериментах Proktor более пятидесяти лет тому назад: пять видов водорослей выращивали попарно в десяти различных сочетаниях. Изучению подвергались представители родов *Chlamidomonas, Haematococcus, Scenedesmus, Anacystis* и *Chlorella.* Установлено, что во всех сочетаниях угнетаются один или оба вида. Особенно агрессивен вид *A. nidulans*, который полностью или почти полностью останавливал рост всех других четырех видов. По-видимому, имеет место химическая борьба не только между видами, но и между штаммами одного вида. Некоторые вещества, продуцируемые фитопланктонными водорослями, могут оказаться перспективными альгицидами. Считают, что ингибирующее воздействие на другие водоросли и даже клетки своего же вида есть побочный продукт эволюционной выработки токсичных веществ против животных-консументов. По-видимому, наблюдаемые в природе резкие колебания численности популяций различных видов фитопланктона и смена доминирующих видов в течение вегетационного сезона определяются указанными аллелопатическими взаимодействиями с участием токсических веществ.

Репозиторий ВГУ

5. *Подавление фитопланктона веществами водных макрофитов.* Водоросли популяции *Chara* (харовые водоросли) редко имеют эпифитов и способны интенсивно подавлять рост фитопланктона в природных местообитаниях. Этот эффект связан с аллелопатическими веществами 5-метилтио-1,2,3-тритианом (подавляет фотосинтез эпифитных диатомовых водорослей в концентрации 3 мкмоля) и 4-метилтио-1,2-дитиоланом (подавляет рост фитопланктона).

6. *Антифунгальным действием* обладают некоторые почвенные водоросли. Например, внесение в почву культуральной жидкости водоросли *Scenedesmus obliquus* вызывает уничтожение возбудителя вилта (увядания) хлопчатника – несовершенного гриба *Verticillium dahliae*. Такой подход может послужить для замены токсичных антифунгицидных препаратов биологически совместимыми субстанциями в сельском хозяйстве.

7. *Паразитизм грибов на грибах* основан на использовании биохимических средств агрессии или защиты. Большинство грибов-микопаразитов вырабатывают эктоферменты – хитиназу, протеиназы, глюконазы, с помощью которых они способны разрушать клеточные стенки многих грибов.

Гриб-паразит может использовать метаболиты, выделяемые потенциальной жертвой, в качестве сигнала, индуцирующего рост его гиф (т.е. эти метаболиты действуют как кайромоны). Так, базидиоспоры *Inonotus rheades* выделяют вещества, стимулирующие *рост гиф паразита*. Но гриб-паразит может также выделять вещества (алломоны, аттрактанты), вызывающие *рост гиф будущего хозяина* по направлению к колонии микопаразита (*Calcarisporium parasiticum, Gonatobotrys simplex*).

Гриб, защищающийся от атаки паразитов, может вырабатывать алломоны – репелленты, антифунгальные вещества и антибиотики, обладающие антифунгальным действием. Так, микоризный гриб лейкопаксиллюс (*Leucopaxillus cerealis*) выделяет антибиотик с антифунгальным действием, который предотвращает заселение корней сосны другими грибами, включая патогенные. В результате устойчивость и длительность существования всей микоризной ассоциации возрастают [9, 21].

7.3. Эколого-биохимические взаимодействия между грибами и высшими растениями

Биохимические механизмы агрессии и защиты лежат в основе поражения высших растений грибами. Взаимодействие сосудистого растения с грибами может быть полезным для растения, например, микориза, или наличие грибов-эндофитов в культурных растениях, обеспечивающих продукцию защитных вторичных метаболитов типа пирролизидиновых алкалоидов, N-ацетиллолина, N-формиллолина,

Репозиторий ВГУ

нейротоксинов и других веществ, повышающих устойчивость растения в окружающей среде. Установлено, что зооспоры грибов привлекаются к корням растений, получающих защиту от грибов-эндофитов, химическими аттрактантами. Аттрактантами могут быть первичные и вторичные метаболиты растений: для привлечения зооспор *Pythium aphanidermatum* служит серин, *Aphanomyces raphani* – индол-3-альдегид, *A. Euteiches* – 5,4′-диокси-7-метоксиизофлавон (прунетин). Прунетин широко представлен в растениях (розоцветные, бобовые, ирисы), а также найден среди метаболитов бактерии *Mycobacterium phlei*. Это вещество обладает, кроме относительно специфичной аттрактантной для зооспор активности, также антиоксидантной, эстрогенной активностями и способностью стимулировать оксидазу индолилуксусной кислоты.

Для *агрессии на высшие растения грибы* используют следующие биохимические средства:

1. Грибы вырабатывают *фитотоксины*, включая гликопротеины, фенольные вещества, полиалкогольные молекулы, светоактивируемые токсины и др. Особый интерес представляет светоактивируемый токсин грибов – церкоспорин. При освещении церкоспорин образует активные формы кислорода (синглетный кислород и супероксидный анион-радикал), которые активируют пероксидное окисление мембранных липидов. Информация о фитотоксинах может использоваться при создании гербицидов.

2. *Гиббереллины,* продуцируемые патогеном риса грибом гиббереллой (*Gibberella*, родоначальник термина гиббереллины), а также некоторыми другими аскомицетами, способствуют росту травянитых растений в длину. Это ведет к полеганию стеблей и делает их доступными для атаки сапрофитными грибами. Следует отметить, что гиббереллины адсорбируются почвой и могут сохраняться в ней.

3. *Ферменты* и *ингибиторы ферментов*. К ним относят:

3.1. Пектиназы, катализирующие разрушение пектина и освобождение микрофибрилл целлюлозы от связи с матриксом клеточной стенки (пропектиназа, пектинэстеразы, полигалактуроназы).

3.2. Целлюлазы, разрушающие фибриллы целлюлозы.

3.3. Ферменты, гидроксилирования других полисахаридов (ксилан, галактоманнан, арабиногалактан, хитиназа и др.).

3.4. Ферменты, разрушающие лигнин.

3.5. Группа эктоферментов грибов, разрушающих защитные молекулы растений.

3.6. Протеиназы, танназы, фосфатазы, дегидрогеназы, пероксидазы и др.

Благодаря мощному ферментному аппарату грибы выполняют свою биосферную роль редуцентов, разрушителей органического ве-

Репозиторий ВГУ

щества. Ферменты грибов и бактерий обеспечивают распад в экосистемах устойчивых полимеров.

Ферменты распада целлюлозы и лигнинов из грибов, включая дрожжи, имеют важное биотехнологическое значение.

В последние годы интенсивно изучаются ингибиторы ферментов, образуемые бактериальными клетками и грибами. Эти молекулы способны защищать грибы от биологических патогенов и служить орудием нападения на растения и в конкурентной борьбе на другие грибы.

4. Для ослабления растений грибы выделяют *вещества, закупоривающие сосуды,* по которым поступает вода. Закупорка происходит вследствие того, что грибы вырабатывают полисахаридные клеи или другие вещества. Так, гриб фузариум (*Fusarium oxysporum*) вырабатывает наряду с патотоксинами вещество вазинфускарин, которое закупоривает проводящие сосуды растения.

5. Гриб может оказывать интоксицирующее действие путем *воздействия на накопление у растений первичных метаболитов*. Например, плесневый гриб ризопус *Rhizopus* может вызывать у растения накопление фумаровой кислоты. Далее растение само окисляет фумаровую кислоту с образованием токсичного эпоксисукцината. Затем эпоксисукцинат превращается в мезовинную кислоту, которая, в свою очередь, окисляется в щавелевоуксусную кислоту. Таким образом, гриб вмешивается в метаболические превращения цикла трикарбоновых кислот, приводя к накоплению токсичного для растения метаболита.

Исход взаимодействия грибов и высших растений определяется биохимическими механизмами нападения и защиты. Исход этой борьбы определяет важный параметр экосистемы: какая доля первичной продукции поступит в детритный канал потребления (в трофическую цепь растение→сапрофиты и т.д.), а какая доля – в пастбищную цепь. Поэтому все рассмотренные химические вещества являются хеморегуляторами в экосистемах, или химическими ценозорегуляторами.

Для *защиты от нападения грибов* растения используют следующие биохимические механизмы, включающие две группы защитных веществ: 1) *преинфекционные соединения* – постоянно присутствуют в высшем растении независимо от того, произошла атака гриба на него или нет; 2) *постинфекционные соединения* – появляются в высшем растении после инфекции гриба.

1. К *преинфекционным соединениям* относят 1) *прогибитины* – постоянно предсуществующие в растении метаболиты, которые уже в имеющейся концентрации уменьшают или полностью останавливают развитие патогена in vivo; и 2) *ингибитины* – метаболиты, концентрация которых в тканях растения после инфекции резко увеличивается.

Следует отметить, что многие преинфекционные соединения защищают растения не только от грибов, но и участвуют в аллелопа-

Репозиторий ВГУ

тическом подавлении других растений или в какой-то мере уменьшают пищевую активность растительноядных животных.

1.1. *Прогибитины* включают вещества фенольной природы (протокатеховая кислота, катехол из лука *Allium cepa*), пиносильвин из древесины сосны (оксистильбен с двумя оксигруппами), лутеон из люпина, гордатины А и Б из проростков ячменя, авенацин из овса и др. Рассмотрим биохимическое взаимодействие овса и гриба аскомицета офиоболюса (*Ophiobolus graminis*), вызывающего корневую гниль у злаков. У данного гриба в процессе совместной с овсом эволюции выработался фермент авенациназа, который катализирует гидролиз связи, присоединяющей к авенацину терминальный остаток пентозы. После его отщепления авенацин теряет токсичность. Защитную роль играет группа прогибитинов, локализующихся на поверхности растений и препятствующих инфицированию грибами.

1.2. *Ингибитины* включают ароматические соединения, производные кумарина и кумаровой кислоты, концентрация которых возрастает вокруг места инфицирования грибами. Например, при взаимодействии картофеля и гриба фитофторы (*Phytophtora infestans* – класс оомицетов) вблизи места инфекции картофельных клубней спорами фитофторы может резко увеличиваться концентрация кумарина скополетина в 10–20 раз и хлорогеновой кислоты в 2–3 раза.

2. Среди *постинфекционных соединений* выделяют 1) постингибитины – вещества, образующиеся при модификации (гидролизе или окислении) предсуществующих в растении нетоксичных веществ; 2) фитоалексины – метаболиты, которые образуются после инфекции растения заново за счет экспрессии определенных генов или активации латентных ферментативных систем.

2.1. *Цианогенные гликозиды* проявляются при взаимодействии лядвенца (*Lotus corniculatus*, семейство бобовых) и патогенного гриба стемфилиума (*Stemphylium loti*). Лядвенец накапливает цианогенный гликозид – линамарин. Под действием фермента линамариназы от него отщепляется остаток глюкозы. Получившееся соединение спонтанно распадается с образованием HCN. Однако патоген экологически связан с лядвенцем. Это означает, что патоген способен преодолевать биохимическую оборону лядвенца. В ходе коэволюции с данным растением он выработал фермент формамидгидролиазу, который превращает синильную кислоту в формамид. У растений рода брассика (*Brassica*), куда входят капуста, брюква, репа и турнепс, образуется содержащий глюкозу синигрин. Под действием фермента мирозиназы он образует изородановый аллил (аллилгорчичное масло) CH_2=CH-CH_2-NCS. Луковицы тюльпанов (*Tulipa*) находятся долго в земле, но мало поражаются грибами, т.к. содержат гликозиды

Репозиторий ВГУ

1-тулипозид А и 1-тулипозид Б, которые превращаются в высокотоксичные для грибов тулипалины А и Б.

2.2. *Фенолы* приобретают высокую токсичность путем окисления 3,4-оксифенолов в высокотоксичные *о*-хиноны, токсичность последних может быть еще более увеличена при конденсации с аминосоединениями. Таким веществом является постингибитин яблони – производное 3-оксифлоретина. Образование фунгитоксичного *о*-хинона из фенола происходит благодаря ферменту фенолазы, который вступает в действие только после заражения патогеном и нарушения плазматической мембраны клеток.

2.3. *Фитоалексины* включают изофлавоноиды (сем. Маревые и бобовые), полиацетилены (сем. Сложноцветные), терпены, терпеноиды и их производные (сем. Молочайные, Вьюнковые, Мальвовые, Пасленовые), производные фенантрена (сем. Орхидные), бензойной кислоты (сем. Розоцветные) и др. Для фитоалексинов характерно наличие гидрофобных свойств, что позволяет им взаимодействовать с липидным бислоем мембран и повреждать его. Это проявляется в виде лизиса зооспор грибов, быстрой деполяризации мембран хоровых водорослей, потери электролитов, обесцвечивании дисков сахарной свеклы и др. Синтез фитоалексинов активируется *элиситорами*, функции которых могут выполнять углеводы (глюкоманнаны, β-1,3-глюкан, гепта-β-глюкозид), гликопротеины, липиды, эйкозопентеновая и арахидоновая кислоты, соли тяжелых металлов, пестициды, детергенты, УФ-облучение. У грибов выявлены метаболиты-супрессоры, способные ингибировать реакцию образования фитоалексинов у растения-хозяина.

Взаимоотношения грибов и растений эволюционно совершенствовали биохимические механизмы, согласно которым растения вырабатывали более активные фитоалексины и способы молекулярной диагностики начала инфекции, а грибы – более эффективные биохимические механизмы защиты от фитоалексинов.

Известны и другие способы биохимической защиты высших растений от патогенов:

– ингибирование ферментов грибов, расщепляющих компоненты клеточных стенок у растений;

– изменение pH с помощью органических кислот в область, не оптимальную для действия токсинов грибов;

– модификация молекул токсинов и образование менее активных конъюгатов;

– генерация активных форм кислорода для борьбы с грибами.

3. *Экологическая роль биохимической защиты растений* заключается в регуляции раздвоения потока энергии через экосистему на пастбищную и детритную трофические цепи. Та часть растительной

Репозиторий ВГУ

биомассы, которая окажется доступной для грибов, идет по детритной трофической цепи. Защищенная биохимическими механизмами от инфекции грибами часть растительной массы становится пастбищной трофической цепью (питание растительноядных животных). Для хозяйственных целей используют:

– выведение сортов растений, богатых пре- и постинфекционными антифунгальными соединениями;

– обработка растений элиситорами фитоалексинов;

– применение сенсибилизаторов, усиливающих образование фитоалексинов [9, 21].

7.4. Взаимодействие грибов и водорослей с животными

Во взаимодействиях этого типа основное внимание уделяется токсичным и антифидантным веществам. Роль грибов:

1. Грибы продуцируют различные микотоксины. Токсины грибов, обладающих крупными плодовыми телами, служат защитой от животных-консументов до рассеивания спор. Токсины грибов, не образующих крупные плодовые тела, как правило, защищают растения, на которых они паразитируют, от других консументов (спорынья, аспергилл, пенициллиум, фузариум и др.). У этих консументов может возникать опухолевая трансформация клеток за счет действия афлатоксинов или нарушения воспроизводства (зеараленон вызывает феминизацию самцов свиней и выкидыши у самок).

2. Около 10% производимых в мире продуктов питания поражается плесневыми грибами.

3. В настоящее время изучена роль химических медиаторов во взаимодействии хищных грибов и нематод. Нематоды выделяют вещества, служащие индуктором образования ловушек у хищных грибов, а хищные грибы выделяют аттрактанты, привлекающие нематод к ловушкам.

4. Микотоксины действуют через биохимические процессы. Например, α-аманитин ингибирует РНК-полимеразу II, α-сарцин, рестриктоцин и митогиллин ингибируют синтез белков, флавоскирин разобщает дыхание и фосфорилирование в митохондриях.

5. Грибы-симбионты, обитающие на кожных покровах и кожных железах млекопитающих, участвуют в формировании запахового профиля животных, что важно для коммуникации животных друг с другом.

Репозиторий ВГУ

Роль водорослей и цианобактерий:

1. Динофлагелляты выделяют несколько групп токсинов – паралитические (сакситоксин и его производные); диарретические, нейротоксические (бревeтоксины); сигуатоксин и маитотоксин. Морские беспозвоночные могут накапливать токсины динофлагеллят и быть опасными при употреблении в пищу.

2. Многолетние бурые водоросли имеют пищевые детерренты для отпугивания потенциальных консументов – моллюсков. Этими защитными веществами оказались полифенолы. Они по своей экологической функции напоминают полифенолы наземных высших растений, также служащих детеррентами.

3. Между определенными видами водорослей и беспозвоночными животными благодаря экзометаболитам существуют антагонистические взаимоотношения.

4. В симбиозах водных беспозвоночных и фотосинтезирующих водорослей важная роль отводится регуляции образования и обезвреживания активных форм кислорода.

Водоросли вносят существенный вклад в формирование растворенного органического вещества (РОВ) водоемов. Структура РОВ определяет:

1) состояние окислительно-восстановительных процессов и скорость образования свободных радикалов;

2) характер антибактериального потенциала водной среды;

3) связывание и накопление ионов металлов;

4) накопление продуктов распада, включая аминокислоты, эктоферменты, витамины и др.

Эти и многие другие факторы определяют возможность существования и развития водных экосистем [9, 21].

Репозиторий ВГУ

Г Л А В А 8. ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ВЫСШИМИ РАСТЕНИЯМИ, МЕЖДУ РАСТЕНИЯМИ И ЖИВОТНЫМИ

Биохимически опосредованные взаимодействия между высшими растениями разнообразны и важны для понимания жизни растительных сообществ и экосистем в целом.

8.1. Эколого-биохимические взаимодействия между растениями

Можно выделить три типа взаимодействий:

1. Биохимическая *стимуляция роста растений.* Например, из листьев *Artemisia capillaries* выделено биологически активное вещество, названное капилларолом, стимулирующее рост корней риса. Такой вид взаимодействия встречается редко.

2. *Положительное биохимико-информационное взаимодействие* включает передачу химических сигналов от атакованного насекомыми растения ближайшим еще не атакованным соседним растениям, что индуцирует у последних защитную реакцию в виде изменения химического состава листьев. Этот тип взаимодействия изучен недостаточно и встречается редко.

3. Основной тип взаимодействия между растениями – это ингибирующее (негативное) действие веществ растительного происхождения и/или продуктов их распада или микробиологической трансформации. Этот тип взаимодействия рассматривается в рамках явления, названного *аллелопатией* (греч. «allelon» – взаимно, между собой и «патос» – испытываемое патологическое воздействие). Существует узкое толкование аллелопатии – рассматриваются взаимодействия только между высшими растениями и между водорослями. Расширенная трактовка аллелопатии включает биохимические взаимодействия трех видов: 1) между высшими растениями, 2) между водорослями, 3) между растениями и бактериями и грибами.

Среди аллелопатически активных веществ найдены представители разных классов природных соединений: алифатические соединения, жирные кислоты и липиды, цианогенные и другие гликозиды, терпеноиды, фенолы и фенольные кислоты, кумарины, хиноны, флавоноиды, танины, ряд ароматических кислот и др.

Примером важных для метаболизма веществ, проявляющих аллелопатическую активность и цитотоксичность, являются непротеиногенные аминокислоты. В высших растениях найдено около

Репозиторий ВГУ

300 аминокислот. Их цитотоксичность проявляется либо в подавлении синтеза белков, либо в синтезе ненормальных белковых молекул. Механизм цитотоксичности связан с тем, что аминоацил-тРНК синтетазы растений могут активировать непротеинногенные аминокислоты в случае поступления токсинов. В результате синтезируются полипептиды, которые в процессе фолдинга не могут сформировать нативные структуры белков. Следует отметить, что аутотоксичности, как правило, не наблюдается, т.к. аминоацил-тРНК синтетазы растений-продуцентов активируют только протеиногенные аминокислоты.

Существуют аллелопатические отношения между культурными и сорными растениями: взаимное подавление всхожести семян. Так, высушенная зеленая биомасса ржи подавляет развитие сорняков за счет аллелопатического действия β-фенилмолочной и β-гидроксимасляной кислот. Аллелопатически активные экстракты пшеницы содержат феруловую кислоту, которая подвергается декарбоксилированию с участием микроорганизмов с образованием более фитотоксичного стирена 2-метил-4-этинилфенола.

Примером проявления *аутотоксичности* является действие кофеина, содержащегося в плодах и листовом опаде кофе, на проростки этих растений. На плантациях кофе в верхнем слое почвы накапливается 1–2 г/м^2 кофеина за год. Оказалось, что митотическое деление в кончиках корней проростков кофе прекращается после действия 10 ммоль кофеина в течение 12 часов, вероятно, за счет нарушения системы циклинов. Кофеин оказался способным подавлять прорастание и других видов, например, *Amaranthus spinosus*. Экологическое значение подобного вида аутотоксичности заключается в предотвращении прорастания семян, ведущего к переуплотнению растительного покрова, т.е. фактически в предотвращении конкуренции [9, 18, 21].

8.2. Эколого-биохимические взаимодействия растений и животных

Вторичные метаболиты растений широко используются в различных областях науки и производства: дигоксин, морфин, квассин, жасминное масло, винбластин и винкристин и др. Воздействия веществ растений на животных играют важную роль для формирования экологических связей, прежде всего трофических, между первичными продуцентами и животными. Выделяют три большие группы взаимодействий:

1) регуляция веществами растений *пищевого поведения* животных-фитофагов;

2) регуляция вторичными метаболитами растений *развития* и *плодовитости* фитофагов;

3) смешанный тип взаимодействия, включающий регуляцию пищевого поведения и численности фитофагов.

Репозиторий ВГУ

В формирование трофических цепей и в регуляцию потоков энергии и вещества через них важный вклад вносят соединения, содержащиеся в тканях растений и определенным образом воздействующие на животных: запрещающие питание (токсины), отпугивающие своим вкусом или запахом (антифиданты, репелленты, детерренты) и, наоборот, привлекающие (аттрактанты); регуляторы онтогенеза и плодовитости, репелленты овипозиции и др. Для оценки этих процессов необходимо, прежде всего, изучить особенности пищеварения и размножения животных [9].

8.2.1. Биохимическая коэволюция растений и фитофагов

Представления о биохимической коэволюции основано на следующих фактах:

1. Большинство растительноядных животных различают виды растений, являющиеся для них растительной базой. Многие используют в пищу небольшое число близкородственных видов одного рода, трибы или семейства.

2. Кормовые растения данного вида животных могут иметь сходные вторичные соединения, но различаться по общей морфологии и анатомии.

3. Многие вторичные метаболиты растений либо токсичны для животных, либо обладают иной выраженной биологической активностью.

4. Растения могут достигать однотипного решения проблемы защиты от фитофагов разными химическими средствами, например, отпугивающий вкус создается алкалоидами, сердечными гликозидами, тритерпеноидами и др.

5. Известны вещества растений, которые отпугивают одних фитофагов и привлекают других.

Рассмотрим *вторичные метаболиты растений, эволюционно отобранные для защиты от поедания фитофагами*.

1. *Токсины, содержащие азот*:

1.1. *Непротеиногеные аминокислоты*, в частности 3,4-диоксифенилаланин (L-ДОФА). В семенах *Mucuna* (бобовые) ее содержание достигает 6–9%. Токсична для насекомых, нарушает функционирование фермента тирозиназы, участвующего в формировании кутикулы насекомых. β-Цианоаланин встречается в семенах *Lathyris adoratus* (сладкий горошек), высокотоксичен для млекопитающих (у крыс смерть при введении аминокислоты в дозе 200 мг/кг).

1.2. *Цианогенные гликозиды* (около 100 веществ) встречаются почти у 1000 видов 100 семейств. Сами по себе не токсичны, но при ферментативном разрушении образуют HCN – мощнейший дыхательный яд на уровне ингибирования цитохромоксидазы митохондрий. Наиболее изучены линамарин из льна и амигдалин из горького миндаля. Существует две популяции клевера (*Trifolium repens*) – циано-

Репозиторий ВГУ

генная в Англии и ацианогенная в России. В России из-за холодных зим популяция растительноядных моллюсков не успевает быстро вырасти и повредить начальные стадии развития листьев клевера, в результате не сформировалась химическая защита. В Англии слизни и другие моллюски активны круглый год, поэтому цианогенные гено- и фенотипы получили преимущество. Биохимическая адаптация к цианогенным гликозидам у овец и крупного рогатого скота включает активацию фермента роданеза, катализирующего превращение аниона CN^- в тиоцианат, сера которого далее поступает в β-меркаптопируват, а последний превращается в пируват (метаболит общего пути катаболизма). Следует отметить, что образование синильной кислоты в качестве химической защиты происходит также у некоторых животных – у многоножек (защита от муравьев), у некоторых бабочек с предупреждающей окраской.

1.3. *Глюкозинолаты*, например, синигрин у семейства *Brassicaceae*; токсичность связана с выделение изотиоцианатов (горчичных масел). У млекопитающих вызывают гипертироидизм.

1.4. *Алкалоиды* (около 10000) – производные пиридина и пиперидина (н-холиномиметик *никотин* из *Nicotiana spp.*, *анабазин* из *Anabasis aphylla*; оба инсектициды), *кониин* из болиголова *Conium maculatum*; производные пирролидина и тропана (*кокаин*, *гиосциамин*, м-холиноблокатор *атропин* из красавки *Atropa belladonna*); производные хинолина и изохинолина (*морфин*, *кодеин* из опийного мака *Papaver somniferum*, блокатор н-холинорецепторов скелетных мышц *тубокурарин* из яда кураре; производные индола (*стрихнин* из *Strychnos nux-vomica*, *серпентин* из *Rauwolfia serpentine*); производные пурина (*кофеин*, *теобромин*); стероидные алкалоиды (*соланин* из картофеля *Salanum tuberosum*, α-*томатин* из томата); производные имидазола (м-холиномиметик *пилокарпин* из *Pilocarpus pinnatifolius*); ациклические алкалоидные амины (*эфедрин*, *колхицин* из безвременника *Colchicum spp.*); пирролизидиновые алкалоиды.

В некоторых растениях обнаружен новый класс алкалоидов – полигидроксильные алкалоиды. Это подобные моносахаридам вещества, в молекуле которых один атом кислорода заменен на азот. Их называют «сахарообразным оружием растений», поскольку эти аналоги моносахаридов подавляют активность ферментов обмена (распада) углеводов у животных: дезоксиманоримицин из *Lonchocarpus sericeus* ингибирует α-маннозидазу, а кастаноспермин из *Castanospermum australe* – α-глюкозидазу.

Алкалоиды могут накапливаться в организме насекомых, выполняя функции химической защиты. Пирролизидиновые алкалоиды используются некоторыми насекомыми для биосинтеза феромонов для привлечения самок – пиррол-2 и пиррол-3. У высших млекопитающих

Репозиторий ВГУ

пирролизидиновые алкалоиды токсичны для печени (вызывают повреждения венозной системы). Поэтому водные экстракты примерно 150 растений (мать-и-мачеха, зверобой, окопник и другие травы народной медицины) как лекарства запрещены в ряде развитых стран.

1.5. *Вещества пептидной природы*. Известны токсичные пептиды из омелы белой *Viscum album*. Примером токсичных белков являются лектины. В семенах африканского растения *Abrus precatorius* (семейство бобовые) содержится абрин, летальная доза которого для человека 500 мкг. В семенах клещевины *Ricinus communis* содержится токсичный рицин, который ускоряет перемещение семян по пищеварительному тракту фитофагов, предотвращая тем самым их переваривание и способствуя распространению.

2. *Токсины растений, не содержащие азот.*

2.1. Группа *негликозидных токсинов*. Простейшим примером является монофторуксусная кислота CH_2FCO_2H. Она встречается в некоторых южноафриканских растениях (например, *Dichapetalum cymosum*). Летальная доза для человека 2–5 мг/кг массы тела за счет ингибирования цитратсинтазной реакции цикла трикарбоновых кислот.

2.2. *Терпеноиды* (монотерпены, сесквитерпены и дитерпены) чаще обладают антифидантным и репеллентным действием. Терпеноидный альдегид госсипол участвует в формировании резистентности растений к нематодам. К токсичным терпеноидам относятся сапонины. Например, в люцерне (*Medicago sativa*) содержится медикагеновая кислота, токсичная для насекомых и рыб. Из растений семейств *Euphorbiaceae* и *Thymelaeaceae* получена группа токсичных форболовых эфиров, вызывающих отравления выпасаемых домашних животных.

2.3. *Флавоноиды* широко распространены среди покрытосеменных, голосеменных, папоротников и мхов. Хорошо известный в биохимии флавоноид ротенон из корней *Derris, Tephrosia* и *Lonchocarpus* (семейство бобовые), токсичный для насекомых и рыб, ингибирует цепь переноса электронов в митохондриях и используется как пестицид.

2.4. *Хиноны*, например, гиперицин из листьев зверобоя *Hypericum perforatum,* токсичен для млекопитающих.

2.5. К группе биологически активных вторичных метаболитов относят также *полиины*, или *полиацетилены* (например цикутотоксин из корней *Cicuta virosa* и энантетоксин из корней *Oenanthe crocata* из семейства зонтичных), токсичные для млекопитающих; простые фенолы; пиретрины – производные циклопропанкарбоновой кислоты из *Chrysanthemum cinearifollum,* издавна известные как инсектициды (порошок из размолотых цветков растения-продуцента) и отличающиеся способностью быстро разлагаться в окружающей среде и др.

2.6. Растения могут поглощать и накапливать в своих тканях *микотоксины*, вырабатываемые почвенными грибами, и эти микотоксины затем выполняют защитную функцию от фитофагов [9].

Репозиторий ВГУ

8.2.2. Механизмы биохимического взаимодействия растений и животных

Сердечные гликозиды – это защитные вторичные метаболиты стероидной структуры, обладающие кардиотонической активностью у человека и других млекопитающих. К этой группе относят дигитоксин, дигоксин, строфантин G (уабаин), олеандрин и многие другие. Они ингибируют мембранные АТФазы, оказывают влияние на трансмембранный транспорт ионов калия, натрия, кальция, процессы аккумулирования и использования энергии, мышечное сокращение.

Экологическое значение этих *гликозидов* рассмотрим на примере системы гликозид – насекомое:

1. Ряд видов растений, например, ваточник *Asclepias curassavica* и другие представители этого рода (семейство ластовневых *Asclepiadaceae*), а также олеандр *Nerium oleander* (семейство кутровых *Apocynaceae*), образует сердечные гликозиды, служащие для пассивной защиты от фитофагов.

2. Гусеницы нескольких видов бабочек данаид и некоторые другие насекомые приспособились накапливать гликозиды в своем организме. Эти насекомые, питаясь токсичным для других видов кормом, избавляются от конкуренции со стороны других фитофагов.

3. Гусеницы превращаются в имаго – бабочек, которые сохраняют накопленные гусеницами сердечные гликозиды.

4. Насекомоядные птицы ловят бабочек; поскольку сердечные гликозиды имеют отталкивающий вкус, то при повторной ловле данаид у птиц вырабатывается отрицательный рефлекс на этих яркоокрашенных бабочек.

Бабочки данаиды зависят от двух групп веществ, вырабатываемых растениями: сердечных гликозидов и пирролизидиновых алкалоидов. Эти две группы веществ вырабатываются растениями разных семейств, что делает экологию межвидовых связей сложной: сердечные гликозиды этим бабочкам надо получать от растений семейств ластовневых и кутровых, а пирролизидиновые алкалоиды – от растений семейств бурачниковых и сложноцветных [9].

8.3. Сигнальные молекулы, биохимия онтогенеза и плодовитости фитофагов

До настоящего времени недостаточно изучено воздействие веществ растений на размножение, наследственный аппарат и онтогенез позвоночных животных. Целесообразно рассмотреть следующие примеры экологических хемоэффекторов: 1) содержащиеся в растениях гормоны и ингибиторы линьки; 2) вещества растений, действующие как ювенильные гормоны; 3) хемостерилянты.

Репозиторий ВГУ

8.3.1. Синтез растениями гормонов и ингибиторов линьки членистоногих

Онтогенез насекомых включает в себя несколько стадий с участием гормона линьки (ГЛ) и ювенильного гормона (ЮГ): личинка I (ГЛ/ЮЛ) → личинка II (ГЛ) → куколка (ГЛ) → имаго. У различных насекомых число личиночных стадий может быть больше (3–5 и более). Переход от стадии к стадии является регулируемым и наиболее уязвимым этапом жизненного цикла насекомых. Поскольку для правильного развития насекомых необходим достаточно точный баланс выработки и концентрации в организме обоих гормонов, эволюционно должны были сформироваться защитные биохимические механизмы у растений, направленные на эти этапы гормональной регуляции онтогенеза насекомых.

1. *Экдизоны* – это гормоны линьки и метаморфоза стероидной природы (от двух греческих слов – снимать + выходить). Выделяют α-экдизон и β-экдизон (экдистерон), причем α-экдизон превращается в β-экдизон путем гидроксилирования в положении 20. α-Экдизон преимущественно стимулирует отслойку старой кутикулы и перестройку гиподермы. β-Экдизон обеспечивает отложение новой кутикулы. Ювенильный гормон регулирует постадийное развитие насекомых, способствует росту и развитию личиночных органов и предотвращает превращение личинки в куколку и во взрослое насекомое, т.е. тормозит метаморфоз. В течение личиночной стадии ювенильный гормон тормозит активность экдизона. Если за некоторый срок до выделения экдизона в гемолимфу насекомого концентрация ювенильного гормона достигнет порогового уровня, то индуцируемая экдизоном линька будет носить личиночный характер, в отсутствие ювенильного гормона – куколочный или имагинальный.

В конце 60-х годов прошлого века японскими учеными были обнаружены большие количества β-экдизона в листьях тиса *Taxus baccata*, причем одинаковое количество гормона линьки 25 мг можно было получить из 50 кг куколок шелкопряда, или из 25 г сухих листьев тиса, или 2,5 г корневищ папоротника *Polypodium vulgare*. В настоящее время фитоэкдизоны получают более чем от 100 семейств голосеменных, покрытосеменных и др. Оказалось, что растительные экдизоны обладают большей биологической активностью, чем из организма насекомых. Кроме того, в организме насекомых фитоэкдизоны метаболизируются до 4 раз медленнее.

Особенность действия *фитоэкдизонов на насекомых*:

– при введении в организм насекомых фитоэкдизоны нарушают рост, вызывают стерильность и даже гибель;

– насекомые некоторых видов приспосабливаются обезвреживать поступающие с пищей фитоэкдизоны. Вероятно, структурное

Репозиторий ВГУ

многообразие фитоэкдизонов – это молекулярный механизм насекомых преодолеть защитные механизмы растений;

– фитоэстрогены предназначены для сдерживания активности фитофагов и не подавлять их полезные для растений функции, поэтому, как правило, они не вызывают массовую гибель насекомых.

Некоторые растения способны вырабатывать *ингибиторы линьки*, например, из тропического растения *Plumbago capensis* (семейство *Plumbaginaceae*) выделено вещество плюмбагин, подавляющее линьку, обладающее антифидантным действием, ингибирующее хитинсинтазу и тормозящее рост насекомых.

Нарушение линьки иногда связано с образованием *многослойной кутикулы* за счет повреждения механизмов сбрасывания старой кутикулы. Это приводит к голоду из-за изменения морфологии ротового аппарата насекомых. Таким эффектом обладают циастерон и экдистерон из листьев и корней восточноафриканского лекарственного растения айюги *Ajuga remota* (семейство *Labiatae*).

2. *Ювенильный гормон* представлен, как минимум, 4 веществами и может образовываться некоторыми растениями. Это открытие было сделано, когда в эксперименте по выращиванию насекомых была заменена европейская фильтровальная бумага на американскую. В этом случае жизненный цикл насекомого клопа-солдатика прерывался. Оказалось, что американскую бумагу получали из пихты бальзамической, из которой выделено вещество *ювабион* и именно это вещество действует на жизненный цикл исследуемых клопов.

У ряда растений, например, у растения из семейства сложноцветных *Ageratum houstoniatum* найдены два хромена – прекоцен I и прекоцен II. При их добавлении в пищу наблюдается преждевременное развитие, т.к. нимфы клопов пропускают одну или несколько стадий и превращаются в неполноценное имаго. У самок развивается стерильность. Считают, что прекоцены подавляют развитие у насекомых железы *corpus allatum*, в которой вырабатывается ювенильный гормон. Синтетический изопентенилфенол действует подобно прекоцену. Поэтому всю эту группу подобных веществ называют *аллатотоксины*.

3. *Хемостерилянты* – это вторичные метаболиты растений, которые в дозах, не вызывающих гибели насекомых, резко снижают их плодовитость. Например, алкалоиды из листьев растения *Catharanthus roseus* оказывают стерилизующее действие на вредителя хлопчатника красноклопа. Или пары масла аира *Acorus calamus* (которым украшают жилища к раннелетнему церковному празднику Троице) вызывают стерильность у самцов домашней мухи *Musca domestica*, самок долгоносика *Callosobruchus chinensis,* некоторых видов клопов и жуков.

4. Некоторые метаболиты растений могут оказывать множественное воздействие на фитофагов, действуя на биохимические меха-

Репозиторий ВГУ

низмы цитотоксичности (некроз, апоптоз), продукцию половых клеток. Так действует *госсипол* из хлопчатника некоторых видов, обладающих повышенным синтезом этого вторичного метаболита: повышается смертность на 30%, уменьшается плодовитость самок в 2 раза и снижается показатель воспроизводства популяции фитофага-вредителя в 4 раза [9, 21].

8.3.2. Хеморегуляторы растений и позвоночных животных

Выделяют три группы веществ, продуцируемых растениями: 1) подавляют сперматогенез и плодовитость самок; 2) активируют мутагенез и канцерогенез; 3) стимулируют воспроизведение фитофагов.

1. Установлено, что у многих растений синтезируются аналоги мужских и женских половых гормонов. Например, для прерывания беременности женщины в Бирме и Таиланде использовали издавна экстракт из корней растения семейства бобовых (*Pueraria mirifica*), в котором был найден стероид *мирэстрол*. В овцеводческой стране Австралия на пастбищах укоренился вид клевера подземного (*Trifolium subterraneum*), в котором синтезируются вторичные метаболиты изофлавоны – *генистеин* и *формононетин*. Эти вещества являются проэстрогенами и в организме самок превращаются в эстрогены, ведущие к прерыванию беременности (до 1 млн ягнят теряется ежегодно). Кроме того, продукты их метаболизма являются также фитоалексинами. В Белоруссии аналогичные вещества открыты в кормовом люпине.

Каннабиоиды и марихуана из конопли (*Cannabis indica*) в природе уменьшают плодовитость млекопитающих и увеличивают количество хромосомных нарушений в нескольких поколениях животных. В настоящее время считают, что большинство биохимических систем млекопитающих прямо или опосредованно поражаются каннабиоидами (гашиш – смесь водонерастворимых смолистых компонентов конопли, марихуана): нарушение функции мембран, образование внутриклеточных посредников действия гормонов и других сигнальных молекул. В одной сигарете содержание тетрагидроканнабинола достигает 10 мг на сухую массу, а стерилизационные и генотоксические эффекты в эксперименте на грызунах проявляются при введении в их организм в 3 раза большей дозы.

Госсипол из хлопчатника является полифенолом и оказывает контрацептивное действие при введении в организм самцов (при приеме с пищей в дозах 15–40 мкг/кг массы тела на протяжении 2–4 недель). Госсипол обратимо нарушает количественно и качественно процесс сперматогенеза. В Китае это вещество в дозе 20 мг в день применялось для временной стерилизации мужчин.

В *корнях цикория* (*Cichorium intylus*) также содержатся вторичные метаболиты, подавляющие сперматогенез у млекопитающих.

Репозиторий ВГУ

2. Некоторые виды сосудистых растений содержат мутагенные вещества, чаще всего производные флавоноидов, например, кверцетин, кемпферол, изорамнетин. Пирролизидиновые алкалоиды канцерогенны для грызунов.

3. Фитогормон *гиббереллoвая кислота* GA_3 в микромолярной концентрации стимулирует вдвое плодовитость самок домашних мышей. Плодовитость мышей-полевок повышает 6-метоксибензоксазолинон, образующийся в весенних всходах ряда злаков и некоторых сложноцветных. Интересно, что это же вещество является антифидантом для насекомых.

Итак, различные экологические хемоэффекторы служат для сдерживания натиска фитофагов и использования взаимодействия с ними для оптимизации существования популяции. Как правило, в основе таких взаимодействий лежат конкретные биохимические механизмы биосинтеза вторичных метаболитов у растений и воздействие этих вторичных метаболитов на наиболее чувствительные биохимические процессы фитофагов, определяющих их жизнедеятельность:

1) отпугивание пищевыми детеррентами;

2) ингибирование ферментов и нарушение мембран токсинами;

3) нарушение процессов потребления и переваривания пищи;

4) нарушение воспроизведения фитофагов. Вторичные метаболиты растений действуют:

– на молекулярном уровне, влияя на кинетику ферментативных процессов;

– на тканевом уровне, изменяя функционирование органов за счет цитотоксических, мутагенных, канцерогенных, стерилизационных эффектов;

– на уровне целостного организма путем взаимодействия с эндогенными нейрорецепторами, изменением образования нейропептидов.

Все указанные механизмы реализуются суммарно на популяционном уровне в рамках определенного биогеоценоза, обеспечивая выработку и эволюционное закрепление наиболее полезных и эффективных вариантов взаимодействий растений и животных.

Как видно из приведенных материалов человек является членом биогеоценозов и все выявленные закономерности характерны и для него. Но человек способен вычленять те или иные метаболиты и использовать их как лекарства, сигнальные молекулы, вещества-регуляторы численности популяции и др. С другой стороны, вторичные метаболиты растений при их использовании без должного научного анализа могут приводить к крайне негативным последствиям (наркомании, отравлениям, канцерогенезу) [9, 18, 21, 29].

Репозиторий ВГУ

ГЛАВА 9. **ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ЖИВОТНЫМИ**

Эти взаимодействия делятся на две группы: 1) взаимодействия между животными одного вида; 2) взаимодействия между животными различных видов (хищник–жертва, хозяин–паразит).

9.1. Внутривидовые взаимодействия

Внутривидовая химическая коммуникация осуществляется с помощью сигнальных молекул – *феромонов*. Такой тип коммуникативных связей необходим для поддержания жизнеспособности популяций, поиска пищи и воспроизводства.

9.1.1. Феромоны

Феромоны – это вещества, вырабатываемые и выделяемые в окружающую среду живыми организмами (часто с помощью специализированных желез) и вызывающие специфическую ответную реакцию (характерное поведение или характерный процесс развития) у воспринимающих их особей того же биологического вида. С учетом современных данных можно уточнить это определение: *феромоны – это сигнальные молекулы (индивидуальные вещества или комплексы разных веществ), выделяемые во внешнюю среду одними организмами, несущие информацию для инициирования или ингибирования определенной реакции поведения, биохимических и физиологических процессов, а также процессов развития других организмов обычно того же биологического вида.* Феромоны делятся на три основные группы:

1) *феромоны-релизеры* вызывают *немедленные* поведенческие эффекты (изменение поведения) у реципиентов (следовательно, быстрые биохимические процессы восприятия сигнальных молекул с последующей модуляцией биохимических процессов, прежде всего движения – половые феромоны, феромоны тревоги, следа и феромоны мечения территории);

2) *феромоны-праймеры* вызывают *длительные* биохимические и физиологические эффекты (изменения) в воспринимающем организме (следовательно, пролонгированные реакции, связанные с экспрессией определенных генов и последующим изменением функции органов или систем органов – регуляция принадлежности особей общественных насекомых к определенной «касте», наступление половой зрелости у самок, синхронизация периодов наибольшего благоприятствования для наступления беременности и пр.);

3) *феромоны-ингибиторы* роста и развития других особей того же вида.

Репозиторий ВГУ

9.1.2. Феромоны беспозвоночных животных

Исторически сложилось так, что наиболее тщательно были разработаны методы работы с феромонами чешуекрылых. Все способы выделения феромонов этих насекомых можно разделить на три группы: 1) смыв компонентов феромонов с поверхности феромонной железы или кончика брюшек при коротком контакте растворителя с биологическим материалом; 2) экстракция при длительном контакте растворителя с биологическим материалом; 3) сбор паровой фазы над железой.

Выделяют следующие основные виды феромонов у беспозвоночных животных:

1. *Половые феромоны* подразделяют на *аттрактанты* (вещества, способствующие сближению самца и самки) и *афродизиаки* – химические вещества, выделяемые особями при приближении потенциальных половых партнеров друг к другу и способствующие подготовке индивидов другого пола к копуляции. Феромоны самцов чаще афродизиаки; они могут выполнять различные функции – подавление двигательной активности самок, прекращение выделения самками их феромонов, маскировка феромона самок и тем самым предотвращение подлета новых самцов. Скорость эмиссии феромонов составляет 0,1–100 нанограммов в час одной самкой. Чувствительность феромонной коммуникации велика. Так, у тараканов предельная действующая концентрация составляет 10^{-14} мкг/мл и расстояние десятки–сотни метров, а у бабочек тутового шелкопряда предельная действующая концентрация полового феромона бомбикола составляет 10^{-12} мкг/мл.

2. *Феромоны тревоги* найдены у общественных насекомых муравьев, пчел, термитов и др. Одно и то же вещество может служить феромоном тревоги для разных видов, например, гексен-2-аль – для некоторых видов клопов и муравьев. Специфичность этих феромонов ниже по сравнению с половыми. Феромоны тревоги описаны и у гидробионтов, например у актиний бетаин выделяется при повреждении в дозе $3{,}5\times10^{-10}$ моль/л, что вызывает смыкание щупалец у соседних организмов.

3. *Агрегационные феромоны* служат сигналом к скоплению и состоят, как правило, из нескольких химических веществ (до 6–8). Часто скопление насекомых происходит под влиянием комплекса агрегационного феромона и летучего вещества растения. Такой комплекс (агрегационный аттрактант) можно выделить из воздуха над участком дерева, заселенным питающимися короедами-первопоселенцами.

4. *Следовые феромоны* – это вещества, входящие в состав пахучих смесей, которыми насекомые могут метить свой корм и пути, ведущие к нему. О высокой эффективности феромонов следа свидетельствует следующий факт: муравьи-листорезы (*Atta texana*) распознают свой следовой феромон (метил-4-метилпиррол-2-карбоксилат) в концентрации 0,08 пг/см, или $3{,}48\times10^{8}$ молекул/см, т.е. для мечения пути

Репозиторий ВГУ

вокруг земного шара потребуется всего 0,33 мг этого вещества. Следовые феромоны служат *кайромонами* (т.е. веществами, приносящими пользу их реципиенту, а не донору) для хищных членистоногих и позвоночных (змеи), которые отыскивают добычу (муравейник) по запаху.

5. *Феромоны метки* напоминают феромоны следа, и этот термин употребляют, когда описывают химическое маркирование хищными насекомыми обследованных ими территорий как способ оптимизации времени поиска жертвы. К этой группе феромонов относят *детерренты овипозиции* – вещества, которыми откладывающие яйцо самки насекомых метят либо само яйцо, либо субстрат, на который оно отложено, чтобы избежать повторной откладки яйца. Этим приемом предотвращается избыточная плотность личинок у двукрылых, чешуекрылых и некоторых жуков и связанная с этим внутривидовая конкуренция за кормовую базу.

6. *Полифункциональные феромоны*. К этому типу феромонов относится «царское вещество», вырабатываемое пчелиной маткой, куда входит 9-кето-2-транс-деценовая кислота, выполняющая совместно с другими веществами, вырабатываемыми мандибулярными железами, следующие функции:

– привлечение рабочих пчел к матке;

– при облизывании тела матки рабочие пчелы получают царское вещество, которое подавляет у них развитие яичников;

– царское вещество подавляет у обитателей улья стремление строить «царские ячейки» для выкармливания будущей матки;

– компоненты царского вещества служат половым феромоном, привлекая самцов к матке во время брачных полетов.

Полифункциональные феромоны наиболее характерны для общественных насекомых, выполняя сложные сигнальные функции разного типа в интересах поддержания жизнедеятельности их сообщества.

7. *Другие типы феромонов.* Использование феромонов в качестве сигнальных молекул нашло широкое распространение в биоценозах. Кроме перечисленных групп феромонов можно отметить следующие виды:

– у пустынной саранчи половозрелые самцы выделяют феромон, инициирующий биохимические механизмы синхронизации полового созревания других особей;

– некоторые самцы пауков, например, тарантулы рода *Lycosa*, выделяют феромоны, подавляющие репродуктивную активность других самцов того же вида;

– у нематод феромоны могут включать биохимические процессы перехода в состояние дауэр-личинки, т.е. покоящегося состояния для преодоления неблагоприятных условий среды (истощение кормовой базы, переуплотнение популяции и др.);

Репозиторий ВГУ

– бактерией *E. coli* и некоторыми дрожжами образуются вещества, подавляющие образование дауэр-личинок и запускающие биохимические процессы формирования взрослых половозрелых особей [9].

9.1.3. Биосинтез феромонов

Обычно сигнальная функция феромонов реализуется несколькими веществами. Поэтому метаболические пути биосинтеза таких молекул являются сложными. В синтезе компонентов феромонов могут участвовать симбиотические организмы, например, бактерии пищеварительного тракта. Компоненты феромонов могут заимствоваться из химических веществ внешней среды. Чаще всего такие молекулы заимствованы у растений:

– самцы бабочек данаид используют пирролизидиновые алкалоиды из растений семейства сложноцветных в качестве предшественников пиррола-2 и пиррола-3, которые привлекают самок и снижают их двигательную активность для совершения брачной церемонии;

– из древесины – кормовой базы некоторых термитов – выделена капроновая кислота, выполняющая роль следового феромона у насекомых;

– содержащийся в кормовых растениях α-пинен служит исходным соединением для биосинтеза феромонов цис-вербенола и транс-вербенола у некоторых видов жуков, причем это биохимическое превращение осуществляют бактерии *Bacillus cereus*, обитающие в пищеварительном тракте жуков;

– компоненты царского вещества пчелиной матки синтезируются в организме матки из ненасыщенных жирных кислот пыльцы клевера и некоторых других растений.

При исследовании половых феромонов самок чешуекрылых установлен достаточно ограниченный набор непредельных спиртов, ацетильных производных и альдегидов с 10–18 атомами углерода. Строгая специфичность создается 1) присутствием различных веществ, служащих основными компонентами; 2) наличием минорных компонентов (1–5% от массы основного компонента). Если основное вещество феромона представлено изомерами, требуются специальные биохимические механизмы, создающие необходимое для аттрактантного или репеллентного эффекта соотношение изоформ.

Некоторые простые вещества, входящие в состав феромонов (гептанол-1, гептанол-2, фенол, валериановая и н-гексановая кислоты, пентадекан, гексадекан, гептадекан, октадекан и др.), могут быть в составе промышленных отходов, что повышает вероятность нарушения сигнальной коммуникации у живых организмов [9].

9.1.4. Практическое использование феромонов насекомых

Основной путь использования феромонов – это контроль численности насекомых. Для этого используют естественные и синтети-

Репозиторий ВГУ

ческие химические вещества, оказывающие действие, характерное для действия феромонов:

– введение половых феромонов в воздух ведет к нарушению сигнализации между полами и воспроизводства насекомых;

– с помощью феромонных ловушек снижается популяция насекомых;

– использование феромонов совместно с инсектицидами (обычно используют половые аттрактанты и феромоны тревоги, которые повышают двигательную активность насекомых, а, следовательно, их контакт с инсектицидом), что приводит к снижению дозировок применяемых инсектицидов [9].

9.1.5. Феромоны и химическая сигнализация позвоночных

Развитие и совершенствование обонятельных рецепторов и органов обоняния у позвоночных делает передачу информации путем переноса в воздухе сигнальных молекул предпочтительной. Такие сигнальные молекулы должны обладать способностью легко переходить в газообразное состояние. В синтезе таких соединений могут участвовать микроорганизмы, перерабатывающие нелетучие вещества выделений экзокринных желез и пота (например, у рыжей лисицы так образуются диамины путресцин и кадаверин).

В процессе эволюции отобрались и закрепились 7ТМ-рецепторы, с которыми связываются сигнальные молекулы. Внутри клетки с рецептором взаимодействуют G-белки (ГТФ-зависимые белки), обеспечивающие образование внутриклеточных посредников (циклические нуклеотиды – цАМФ, цГМФ, продукты гидролиза фосфатидилинозитолов – инозитол-3-фосфат и диацилглицерол, ионы кальция), которые включают каскады реакций, ведущих к функциональным ответам. Для активации этих рецепторов служат следующие типы сигнальных молекул.

1. *Химические вещества полового поведения* в реализации функции воспроизведения себе подобного:

– диметилдисульфид вагинальных выделений хомяка служит половым аттрактантом и возбудителем для самцов;

– пахучие вещества препуциальной железы самцов грызунов стимулируют половую активность самок;

– характерный запах, выделяемый самцами свиньи, определяется веществами 5α-андрост-16-ен-3α-олом и родственным ему 3-кетоном и вызывает половое возбуждение у самок;

– к феромонам самок ряда обезьян и других приматов, содержащихся в вагинальных выделениях и возбуждающих самцов, относятся органические кислоты – уксусная, пропановая, метилпропановая, бутановая, метилбутановая, метилпентановая.

Репозиторий ВГУ

2. *Химические вещества мечения территории,* т.е. мечение участка, необходимой и достаточной кормовой базы:

– длинноцепочечные спирты и органические кислоты с короткой цепью (например, изовалериановая кислота), выделяемые субаурикулярными железами самцов вилорога *Antilocapra americana*;

– фенилуксусная кислота, служащая для мечения территории у самцов песчанки *Meriones unguiculatus*.

3. *Алломоны* – сильнопахнущие вещества, продуцируемые некоторыми животными при стрессе, например, анальными железами полосатого скунса *Mephitis mephitis* выделяется при стрессе пахучая смесь, включающая три серосодержащих соединения – кротил-, изопентилмеркаптан, метилкротилсульфид. Здесь же следует отметить наблюдение автора – поверхность раны выделяет химические вещества, которые вызывают у интактных животных биохимические признаки стресс-реакции (повышение концентрации кортикостерона в плазме крови).

4. *Флемен* – характерная поведенческая реакция млекопитающих на химические компоненты мочи:

– в условиях перенаселения с мочой половозрелых самок мышей выделяются вещества, подавляющие эстральный цикл и наступление зрелости у молодых самок с целью предотвращения еще большей скученности особей;

– в моче самцов имеется феромон (пептиды с молекулярной массой 860 Да), включающий биохимические процессы готовности самок к размножению;

– в моче самок грызунов открыты вещества, выполняющие роль аттрактантов, стимуляторов полового поведения и регуляторов агрессивности самцов;

– в моче стрессированных крыс имеются вещества, которые индуцируют у интактных животных те же биохимические процессы, что и у стрессированных;

– рыжие полевки способны идентифицировать свою мочу и мочу знакомых им особей, а также помнить запах мочи незнакомых особей;

– для передачи информации о принадлежности к своему виду у серых крыс в составе мочи используются пропионовая и уксусная кислоты, н-бутиламин и некоторые другие вещества.

5. Детеныши реагируют на феромоны матери для своевременного кормления и защиты. Некоторые экзометаболиты (эктометаболиты) проявляют свое действие как ингибиторы роста и развития при повышенной плотности популяции.

В водной среде обитания в качестве сигнальных молекул используются водорастворимые экзометаболиты:

– в коже рыб отряда карпообразных содержится феромон тревоги;

Репозиторий ВГУ

– обнаружено подавление оборонительного поведения карповых рыб на феромон тревоги при фенольной интоксикации.

Возможна передача сигнальных молекул при непосредственном контакте животных. Так, при контактах ящериц *Sceloporus occidentalis biseriatus* перед спариванием происходит слизывание с тела партнера химических сигнальных веществ. Считают, что у пресмыкающихся этот процесс достаточно типичен перед спариванием [9].

9.2. Взаимодействия между животными разных видов

Выделяют два типа веществ, определяющих межвидовые взаимодействия:

1. *Алломоны* – вещества, приносящие пользу или преимущество тем организмам, которые их вырабатывают, в результате воздействия, направленного на другие организмы.

2. *Кайромоны* – вещества, приносящие пользу тем организмам, которые их воспринимают.

9.2.1. Алломоны

Включают вещества, обладающие токсическим и отпугивающим действием, в том числе:

1. Низкомолекулярные (хиноны, амины, терпеноиды) и высокомолекулярные (пептиды, белки) токсины и репелленты.

2. Комплексы разнообразных веществ, обладающих токсическим и репеллентным действием.

3. Одно и то же химическое вещество-токсин может использоваться разными видами животных.

4. Некоторые виды животных способны накапливать токсические вещества, полученные из организмов, служащих для этих видов пищей.

Алломоны могут быть средством агрессии (хищные моллюски, кишечнополостные и животные, ядовитые змеи) и средством защиты от нападения хищных видов. Поэтому алломоны являются экологическими хеморегуляторами.

Наиболее токсичными являются для позвоночных яды беспозвоночных, например, кишечнополостных. Так, $ЛД_{50}$ для млекопитающих при действии токсина кишечнополостного *Chironex fleckeri* составляет всего 0,1 мкг/кг. Бушмены, населяющие пустыню Калахари, используют токсин из куколок африканского жука *Diamphidia nigro-ornata* для отравления стрел. Минимальная летальная доза этого токсина для мышей составляет 25 пг (25×10^{-12} г), токсин оказывает гемолитическое действие. Микрофлора моллюсков *Babylonia japonica* синтезирует три бром-содержащих токсина (суругатоксин, неосуруга-

Репозиторий ВГУ

токсин и просуругатоксин), которые являются причиной отравлений людей, питавшихся этими моллюсками. Печальную известность имеет *тетродотоксин*, широко распространенный в природе (рыбы из семейства иглобрюхих, из которых готовят блюдо «фугу», саламандры, костариканские лягушки, осьминоги, моллюски, морские звезды, крабы и др.), и обладающий свойством подавлять перенос ионов натрия через мембраны нервных и мышечных клеток, тем самым нарушая потенциалы покоя и действия.

Известны репеллентные свойства некоторых алломонов. Так, рыба *Pardachirus pavoninus* синтезирует стероидные аминогликозиды павонинины, которые отпугивают акул.

В сложной композиции алломонов (ядов) змей выделяют высоколетальные субстанции (пре- и постсинаптические токсины, кардио- и микотоксины, геморрагические токсины, протеолитические ферменты) и нелетальные токсические вещества (фосфолипазы, антикоагулянты, прокоагулянты, факторы роста нервных клеток, ряд ферментов и др.).

Алломоны имеют практическое значение:

1. Токсины животных служат биофармацевтическим сырьем для получения сильнодействующих лекарств.

2. Аналоги природного токсина морских беспозвоночных – нереистотоксина – являются эффективными инсектицидами (эвисект и банкол против устойчивых к фосфорорганическим пестицидам видов колорадского жука).

3. Палитоксин из морских беспозвоночных служит для изучения активного транспорта ионов через мембраны эритроцитов, заменяя соответствующие АТФазы на поры.

4. Продукты выделения хищных животных и их синтетические аналоги используются как репелленты для сохранения сельскохозяйственной продукции, причем некоторые репелленты индуцируют стресс-реакцию у грызунов (стресс-индуцирующие одоранты) [9].

9.2.2. Кайромоны

К кайромонам относят:

1. Вещества, привлекающие к пище.

2. Индукторы, стимулирующие адаптационные процессы, например, химические вещества беспозвоночного хищника индуцируют у беспозвоночной жертвы образование защитных шипов.

3. Сигнальные молекулы, выделяемые хищником и предупреждающие жертву об опасности.

4. Стимуляторы и факторы роста.

Большой интерес представляют кайромоны для гидробионтов (АМФ, таурин, глицин, бетаин, фосфатидилхолин), выполняющих

Репозиторий ВГУ

роль аттрактантов. Экзометаболиты хищников индуцируют формирование разных морфологических защитных приспособлений у потенциальных жертв ракообразных, коловраток и др. Кайромоны могут использоваться и потенциальными жертвами для обнаружения опасного для них хищника. При изучении морских гидробионтов было обнаружено, что химические вещества, выделяемые морскими звездами, вызывают бегство ряда морских организмов. Предполагают, что феромоны некоторых насекомых могут иногда одновременно выступать в роли кайромонов для их паразитов и хищников. Показано, что некоторые вещества, содержащиеся в тканях и кутикулярных смывах личинок *Heliothis zea*, действуют как кайромоны на самок *Microptilis croceipes* – вида, который является важным паразитоидом для *Heliothis spp*. Наиболее важным компонентом оказался 13-метилентриаконтан.

Завершая изложение материала о принципах химического взаимодействия между живыми организмами, следует отметить недостаточный уровень изученности сигнальных молекул. У млекопитающих исследована роль химической сигнализации в процессах внутривидовых и межвидовых взаимодействий немногим более 10% видов, а у насекомых – на порядок меньше. Остаются не разработанными вопросы «комплектации» композиций, обладающих алломонной или кайромонной активностями. Остается неясной молекулярная природа химических эффекторов, выделяемых внутриорганизменными паразитами (простейшими, гельминтами) и их метаболизм (роль системы цитохрома Р-450, процессов конъюгации). При использовании в качестве химических молекул сигнализации белков и стероидов остаются малоизученными вопросы участия клеточных и гуморальных элементов системы иммунитета [9, 21].

Репозиторий ВГУ

Г Л А В А 10. **БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ЭКЗОГЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В ОРГАНИЗМАХ И ЭКОСИСТЕМАХ**

В экосистемах имеются три источника циркулирующих веществ:

1. *Экзометаболиты*, вырабатываемые живыми организмами и служащие для агрессии, защиты, сигнализации в процессах взаимодействия, экскретируемые продукты метаболизма, а также продукты распада погибших организмов, в том числе накопивших токсические вещества.

2. Химические вещества *антропогенного* характера (промышленные отходы, пестициды, удобрения и пр.).

3. Химические вещества *природного* геолого-минерального профиля территории экосистемы.

Большинство из этих веществ относятся к ксенобиотикам, причем многие из них являются токсическими веществами. Ксенобиотики в живых организмах подвергаются метаболизму. Для клетки, осуществляющей метаболическую трансформацию чужеродного вещества, безразличны источники его происхождения. Главное – это наличие ферментативных систем, позволяющих метаболизировать данное вещество (ксенобиотик, экзометаболит). Учитывая огромный диапазон химических структур ксенобиотиков, их метаболизм и обезвреживание в клетках осуществляются ферментами, обладающими достаточно низкой специфичностью. Это связано с тем, что в процессе эволюции постоянное давление все возрастающего количества ксенобиотиков обеспечило организмам современных экосистем способность разлагать и обезвреживать перманентно увеличивающееся количество чуждых им токсических и антропогенных веществ, загрязняющих биосферу.

10.1. Антропогенные биологически активные вещества и загрязнение биосферы

В настоящее время создано около 10 млн химических веществ; ежегодно их количество увеличивается на 3–5%. Многие из этих веществ обладают биологической активностью, т.е. проявляют мутагенные, канцерогенные, тератогенные свойства, нарушают структуру и функцию ряда систем, отвечающих, прежде всего, за питание и воспроизведение себе подобного. Среди приоритетных органических загрязняющих биосферу веществ выделяют *пестициды, галогенсодержащие вещества, нефть и нефтепродукты, поверхностно-активные вещества* (детергенты, стиральные порошки). Особую тревогу вызывают проблемы химического загрязнения наземных и водных экоси-

Репозиторий ВГУ

стем пестицидами. Пестициды являются примером биологически активных веществ, вносимых человеком в больших количествах в экосистемы (более 5 млн т в год) с целью регулирования численности видов, наносящих экономический ущерб. В настоящее время реально используются более 1000 различных пестицидов. Отбор пестицидов – это сложная процедура, также сопряженная с загрязнением биосферы. Так, для создания нового эффективного препарата, например, фунгицидного действия, испытывают до 50–100 тысяч разнообразных химических соединений.

10.1.1. Структура пестицида и его функции

Для прогнозирования экологического эффекта ксенобиотика и его метаболитов необходимо знать зависимость между физико-химическими и структурными свойствами ксенобиотика и механизмами их биохимического (биологического) эффекта.

Для анализа такой зависимости (QSAR – quantitative structure-activity relationships) используют свыше 40 различных физических и химических характеристик веществ: энтропия жидкости и газа, скорость изменения температуры кипения при изменении давления, молекулярная масса, плотность, молекулярный объем, коэффициент теплопроводности, теплоемкость, температура плавления, поверхностное натяжение, вязкость и др.

1. *Гидрофобность* (липофильность) вещества определяет особенности его трансмембранного переноса, распределение рецепторов к нему в клетке, места депонирования и метаболизма, срок персистирования в организме.

2. Наличие атомов *галогенов* в молекуле вещества увеличивает его устойчивость в биосфере, а при увеличении числа атомов галогенов в молекуле увеличивается срок его персистирования в биосфере.

3. Замена двойных связей в молекуле на *эпоксигруппы* приводит к увеличению биологической активности вещества и пролонгированию срока существования в биосфере.

4. *Конформационные* особенности строения ксенобиотиков определяют их доступность для метаболизма ферментами. Конформационные отличия в структуре пестицидов и их метаболитов обеспечивают, например, более высокую скорость метаболизма у млекопитающих эндрина по сравнению с альдрином.

5. Наличие *нитроаренов* – полициклических фрагментов молекул – придает ксенобиотику канцерогенные свойства. Известны другие компоненты молекул, которые резко уменьшают канцерогенные свойства ксенобиотиков.

Учитывая, что имеются достаточно значимые межвидовые различия в параметрах функционирования ферментов биотрансформации ксенобиотиков, предсказание поведения ксенобиотика в экосистеме пока мало эффективно.

10.1.2. Пестициды и биосфера

Применение пестицидов опасно для биосферы по следующим причинам:

1. Пестициды используют *с огромным запасом*, поскольку до организмов-мишеней, уменьшающих урожай, доходят менее 0,001% от внесенного инсектицида.

Репозиторий ВГУ

2. *Биодоступность* пестицидов, определяющая взаимодействие препарата с биохимическими системами клеток, которые отвечают за подавление жизнедеятельности вредителя урожая, низкая из-за недостаточно высокой вероятности встречи насекомого с пестицидом.

3. Быстро развивается *резистентность* организмов-мишеней к различным пестицидам, причем скорость развития резистентности биохимических систем возрастает по мере увеличения числа обработок пестицидами и объема вносимых веществ.

4. В регионах интенсивного применения пестицидов чаще выявляются железодефицитная анемия, активный туберкулез, вирусные гепатиты, иммунодефициты и пр., обнаруживается более высокая мертворождаемость, а также пре- и постнатальная заболеваемость [9].

10.2. Биохимические аспекты формирования среды обитания и биотрансформации ксенобиотиков

В современной биосфере организмы подвергаются воздействию комплекса природных и антропогенных ксенобиотиков, что имеет ряд экологически важных последствий:

1. Ксенобиотики в биосфере подвергаются *абиотической* и *биотической* трансформации, приводящей к их разрушению, но в ряде случаев к усилению токсических свойств.

2. Поступившие в организмы ксенобиотики претерпевают ферментативную биотрансформацию с целью уменьшения цитотоксичности и иной вредоносности, но иногда приводящую к усилению их активности.

3. *Продукты биотрансформации ксенобиотиков* в результате биотрансформации в организме могут сохранять или даже усиливать биологическую активность по отношению к другим организмам.

Исторически многие ксенобиотики и токсиканты имеют природное происхождение. Например, компонент древесины лигнин, являющийся отходом целлюлозно-бумажной промышленности, выступает как опасный поллютант. Природное происхождение имеют многие ароматические соединения и галогенсодержащие углеводороды. Но биотическое обезвреживание однотипно как для природных, так и антропогенных ксенобиотиков и включает четыре типа реакций:

1) реакции окисления;
2) реакции восстановления;
3) реакции деградации, в том числе гидролиза;
4) реакции конъюгации.

Реакции окисления

Реализуются в эндоплазматическом ретикулуме эукариотических клеток с помощью монооксигеназ со смешанной функцией. Выделяют следующие типы окислительных реакций при биотрансформации ксенобиотиков:

1. Окисление *спиртов* осуществляется малоспецифичной алкогольдегидрогеназой, а *альдегидов* – более специфичными альдегиддегидрогеназами.

Репозиторий ВГУ

2. Окислительное дезаминирование *биогенных аминов* приводит к потере их биологической активности и образованию иона аммония. Но в кислой среде желудка диэтиламин реагирует с нитритом, что приводит к образованию канцерогена – диэтилнитрозамина. Заметим, что нитриты использовались в качестве консервантов пищевых продуктов. При окислении некоторых ароматических аминов происходит образование N-гидроксильных производных, часто проявляющих канцерогенные свойства.

3. Окисление *ароматических алкилпроизводных* осуществляется диоксигеназами с образованием алифатических соединений. Алициклические кольцевые структуры гидроксилируются легче, чем ароматические. Поэтому бензол и ароматические ксенобиотики проявляют высокую цитотоксичность.

4. Образование *эпоксидов* (эпоксидация) осуществляется ферментами микробного или микросомального окисления, например, пестицидов гептахлора и альдрина с образованием гептахлорэпоксида и альдринэпоксида (диэльдрина). Последние вещества высокотоксичны, мутагенны и канцерогенны. Эпоксидации подвергаются многие ароматические соединения.

5. Окисление или окислительное замещение *органической серы*. Известно, что гетероциклическая сера обычно окисляется в сульфоксиды или в сульфоны. Сера в алифатических молекулах или в боковых цепях ароматических соединений иногда замещается кислородом. Например, инсектицид паратион (тиофос) метаболизируется почвенными бактериями или микросомальными ферментами эукариот в параоксон, также обладающий инсектицидными свойствами и почти вдвое более токсичный для млекопитающих, чем паратион.

6. *Окислительное дезалкилирование* осуществляется в присутствии кислорода монооксигеназами: динитроанилины (гербициды трифлурамин, динитрамин и др.), производные фенилмочевины (гербициды хлороксурон, диурон, линурон и др.), симметричные триазины, фосфорорганические соединения и др. Эти реакции осуществляются ферментами микроорганизмов и клетками печени.

В последние годы интенсивно изучают окислительную биотрансформацию ксенобиотиков ферментами водорослей и высших растений. Достаточно типичным итогом реакций окисления ксенобиотиков в эукариотических клетках является образование мутагенных и канцерогенных метаболитов [7, 9, 21].

Реакции восстановления

Встречаются реже:

1. *Альдегиды* и *кетоны* могут восстанавливаться в спирты под действием алкогольдегидрогеназы. Для этих реакций требуются значительные количества НАДН, что может создать конкурентные отношения с процессами образования и аккумулирования энергии в митохондриях эукариот.

2. *Ароматические нитро-* и *азогруппы* обычно восстанавливаются с участием микросомальных и бактериальных ферментов. Возможно образование продуктов, содержащих амино-, гидроксиламино- или нитрозогруппы. Образование нитрозосоединений опасно из-за их высокой канцерогенности.

3. Соединения, содержащие *дисульфидные* группы, расщепляются с образованием SH-соединений. Двойные связи некоторых алифатических или алициклических соединений могут насыщаться. В некоторых случаях реакции гидроксилирования могут обращаться. Ароматические циклы могут восстанавливаться анаэробными микроорганизмами.

4. Восстановление *атомов с переменной валентностью*. Например, трансформация арсенатов с As^{5+} в арсениты с As^{3+}, селенатов с Se^{6+} в селениты с Se^{4+}. При такой трансформации зачастую токсичность вещества возрастает [7, 9, 21].

Репозиторий ВГУ

Реакции деградации

Ведут к уменьшению размеров молекул-ксенобиотиков:

1. Гидролитическому расщеплению подвергаются *эфиры* (ферменты эстеразы, например холинэстеразы, арилэстеразы и др.); алкалоиды атропин и кокаин; фосфорорганические инсектициды (паратион, малатион); пестициды на начальном этапе деградации.

2. Гидролиз *амидов, гидразидов и нитрилов*, например, гидролиз амидной связи при микробиологической деградации фениламидных пестицидов (ациланилидов – пропанил, фенилмочевин – линурон, фенилкарбаматов – хлорпрофам). Многие из изученных амидаз являются эктоферментами.

3. Дезалкилирование. Алкильные группы от *S, O и N-соединений* отделяются ферментами эндоплазматического ретикулума с освобождением соответствующих тиолов, фенолов и аминов. Такие реакции широко используются при деградации пестицидов.

4. Разрывы *кольцевых структур*. Например, при биодеградации *лигнина* выделяют два этапа. Вначале происходит деметилирование метоксильных групп гвайацильных и сирингильных единиц полимерной молекулы лигнина. В результате возрастает содержание орто-дифенольных остатков. Последние затем атакуются диоксигеназами грибов, которые раскрывают ароматические кольца полимеров с образованием алифатических карбоксильных групп. Трофические связи насекомых с растениями определяются способностью расщеплять циклические структуры токсинов растений [7, 9, 21].

Реакции конъюгации

Наряду с рассмотренными ранее типами конъюгации (ацетилирование, соединение с глюкуроновой кислотой, глутатионом, глицином, серной кислотой, метилирование) можно отметить некоторые другие типы, важные для обезвреживания ксенобиотиков:

1. Соединение с *орнитином* (детоксикация бензойной кислоты в организме рептилий и птиц) и с аргинином – в организме членистоногих.

2. *Глутамин* используется у приматов для конъюгации фенилуксусной кислоты и некоторых ее гетероциклических аналогов.

3. *Рибоза* и *глюкоза* используются для конъюгации ксенобиотиков в растениях, у моллюсков и насекомых.

4. В растениях найден новый тип конъюгации – образование нерастворимых конъюгатов с *лигнином* 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, пентахлорфенола, 3,4-дихлоранилина.

5. Металлотионеины – небольшие белки с высоким содержанием *цистеина* связывают ионы тяжелых металлов (например, кадмий).

6. Известны фосфатная конъюгация и реакции с *глицинтаурином* и *формилом*.

Конъюгирование является обезвреживанием вещества лишь для данного организма. Конъюгированное вещество попадает в окружающую среду с выделениями или при распаде тканей и продолжает циркулировать в биогеоценозе, сохраняя свое экотоксикологическое значение [7, 9, 21].

Дегалогенирование

К хлорсодержащим ксенобиотикам относятся многие длительное время загрязняющие биосферу вещества, включая пестициды (ДДТ, 2,4-Д, 2,4,5-Т, 2,3,7,8-тетрахлор-дибензо-n-диоксин и др.). Выделяют три основных типа дегалогенирования:

1. Гидролитическое дегалогенирование происходит при деградации хлорированных алифатических кислот, ароматических пестицидов после расщепления их кольца ферментами почвенных микроорганизмов.

Репозиторий ВГУ

2. Восстановительное дегалогенирование заключается в замене атома хлора на атом водорода. Таким образом многие бактерии, грибы и водоросли трансформируют ДДТ и ДДД. Однако при этом могут образовываться токсичные для клеток метаболиты.

3. Окислительное дегалогенирование включает реакции трех классов: 1) дегидрогалогенирование (фермент ДДТ-дегидрохлориназа, выделенный из устойчивых к ДДТ членистоногих); 2) окислительное дегалогенирование с образованием двойной связи (разложение почвенными микроорганизмами нематоцида этилендибромида, который превращается в этилен); 3) дегалогенирование-гидроксилирование с участием микробных моно- и диоксигеназ (обезвреживание хлорированных феноксиалкановых кислот, фторированных ароматических соединений) [9].

10.3. Филогенетические особенности метаболизма ксенобиотиков

Оценивая метаболизм ксенобиотиков в организмах разных таксонов, можно сделать некоторые обобщения:

1. Реакции *конъюгации* возникли у беспозвоночных – иглокожие и плоские черви. У организмов ветви филогенетического дерева, ведущей к хордовым, преобладают реакции конъюгации с глюкуроновой кислотой, у организмов ветви, ведущей к членистоногим, – конъюгация с глутатионом.

2. У хордовых формируется сложный процесс конъюгации – метилирование, требующий участия витаминов B_9 и B_{12}, а у моллюсков, ракообразных и насекомых видное место занимает конъюгация с глюкозой. Вероятно, использование глюкозы у позвоночных по прямому назначению как источника энергии предпочтительней, чем использование этого вещества для связывания ксенобиотика у членистоногих.

3. Чем выше расположен организм в филогенетическом дереве, тем большим числом вариантов метаболизма ксенобиотиков он располагает. Так, иглокожие располагают 3 основными механизмами (окисление, конъюгация с сульфатом и глюкуроновой кислотой), а у хордовых таких механизмов в 3 раза больше (сульфатация, конъюгация с глюкуроновой кислотой, с аминокислотами, ацетилирование, метилирование, окисление, восстановление, гидролиз); у нематод 3 механизма (конъюгация с глутатионом, восстановление, гидролиз), а у насекомых уже 8 (окисление, восстановление, гидролиз, конъюгация с аминокислотами, ацетилирование, сульфатация, конъюгация с глюкозой и глутатионом).

4. У позвоночных и членистоногих широко представлены ферменты эндоплазматического ретикулума – монооксигеназные системы.

5. Микроорганизмы могут осуществлять полную деградацию, как правило, одного ксенобиотика или осуществлять его частичный метаболизм. Поэтому требуется кооперация микроорганизмов для полной деградации веществ окружающей среды и часто – подключение абиотических факторов (свет, температура и пр.). Генетически способ-

Репозиторий ВГУ

ность некоторых штаммов бактерий разрушать тот или иной ксенобиотик или поллютант зависит от наличия в клетках определенных плазмид – кольцевых ДНК, кодирующих синтез определенных ферментов. Например, один из штаммов почвенной бактерии *Alcaligenes paradoxus* содержит плазмиду, придающую ей способность разрушать гербицид 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту). Благодаря межмикробному обмену плазмидами среди бактерий достаточно широко распространена способность разрушать 2,4-Д. Этот подход использован в технологии рекомбинантных ДНК (генная инженерия) для создания бактерий, способных метаболизировать несколько ксенобиотиков.

При анализе биотрансформации ксенобиотиков в экосистемах следует учитывать два факта:

1. В реальных условиях некоторые ксенобиотики устойчивы в биосфере (ДДТ исчезает из почвы за 30 лет, альдрин – за 15 лет).

2. Некоторые ксенобиотики в процессе биотрансформации приобретают более токсические свойства (мутагенные, канцерогенные) или становятся более резистентными. Например, полициклические ароматические углеводороды могут превращаться в канцерогенные эпоксиды под действием ферментов монооксигеназ, эпоксигидролаз и оксиметилсинтетаз [9].

10.4. Судьба ксенобиотиков в биогеоценозах

Выделяют пять наиболее важных факторов, определяющих судьбу ксенобиотиков в экосистемах.

1. *Распад ксенобиотиков* происходит абиотическим путем под действием гидролиза в водной среде или фотолиза под действием света, также с помощью эктоферментов среды или внутриклеточных ферментов. Продукты распада ксенобиотиков могут длительно персистировать в экосистеме. Например, пестициды из группы этиленбисдитиокарбаматов при разложении дают этилентиомочевину – потенциально канцерогенное вещество. При распаде нематоцида вапама (метамсодиума) в почве образуется метилизотиоцианат – вещество, которое уничтожает насекомых, почвенные грибы, семена растений.

2. *Окислительно-восстановительные реакции* с участием ксенобиотиков могут носить абиотический характер (окисление кислородом воздуха или растворенным в воде, окисление пероксидом водорода и свободными радикалами). Установлено, что скорость деградации ксенобиотиков в нефильтрованной воде выше, чем в фильтрованной. В нефильтрованной воде имеются компоненты, запускающие свободнорадикальные процессы разрушения ксенобиотиков, а именно выделяемый водорослями пероксид водорода – H_2O_2, вещества-антиоксиданты и ионы металлов (чаще в форме комплексных соединений). Токсичность про-

Репозиторий ВГУ

дуктов окисления ряда пестицидов выше, чем токсичность исходных веществ (продукты окисления гептахлора, альдрина, фосфамида).

3. *Реакции конъюгации* предназначены для повышения растворимости гидрофобных ксенобиотиков для выведения их с мочой. При этом ксенобиотик попадает в окружающую среду и продолжает циркулировать в биогеоценозе.

4. *Межфазный перенос ксенобиотиков* определяет условия задержки их в клетках и межклеточных пространствах. Реакции конъюгации (присоединения) важны для перехода ксенобиотика из гидрофобной среды (мембраны) в гидрофильную и назад. Повышение гидрофобности молекул ведет к их задержке в липофильной фазе клеток и тканей, где их биодеградация водорастворимыми ферментами не происходит. Для взаимодействия фермента с гидрофобным ксенобиотиком необходимо эмульгирование последнего, т.е. перевод в такое состояние, когда частица ксенобиотика сможет взаимодействовать с активным центром фермента.

5. *Адсорбция ксенобиотиков* на мелких частицах биотического и абиотического происхождения. Это распространенный способ проникновения экзогенных веществ в клетки путем фагоцитоза или пиноцитоза. В связи с этим явления сорбции-десорбции ксенобиотиков на микрочастицах могут определять биодоступность чужеродных веществ в клетки. Например, пестицид паратион (тиофос) может связываться с почвенными частицами и длительно сохраняться в окружающей среде. Затем по мере ферментативного разрушения гумуса грибами ранее связанные с гумусом молекулы токсиканта освобождаются и могут проявить свое токсическое действие на организмы данной экосистемы. Следует учитывать, что в данном случае речь идет о пестициде, который сам по себе во влажной среде почвы малоустойчив. Известно также, что не сам нематоцид вапам, а его метаболит метилизоцианат адсорбируется на микрочастицах почвы. В результате действие этого токсичного метаболита пролонгируется до двух месяцев.

Два последних фактора во многом определяют переходы ксенобиотиков и их метаболитов из одного блока биогеоценоза в другой: из воды в воздух и обратно, из организмов в воду и обратно, из почвы в воду и т.п. Подобные переходы влияют на крупномасштабные переносы ксенобиотиков в биосфере (переход пестицидов из почвы в воздух в составе пылевых частиц или в процессе испарения и перенос с воздушными массами на большие расстояния с последующим растворением в воде и сохранением в составе льда – это путь появления ДДТ в льдах Антарктиды). При затруднении таких переходов также возможны негативные экологические последствия. Так, переход ртути из почвы в воду происходит крайне медленно (требуются сотни лет). Попавшая в водоемы ртуть метилируется и накапливается в гидробионтах и далее распространяется по пищевым цепям [9].

Репозиторий ВГУ

10.5. Возможности экосистем к обезвреживанию ксенобиотиков

Очистные сооружения являются примером экосистемы, наиболее активно разрушающей поллютанты. Но в процессе функционирования такой искусственной экосистемы происходит накопление биомассы организмов в виде осадка, который может содержать на 1 кг сухой массы: до 16 мг полициклических ароматических углеводородов, до 10 г свинца, до 24 г хрома, нитрозамины, тяжелые металлы, остатки хлорорганических соединений и поверхностно-активных веществ. В реальных биогеоценозах могут накапливаться ксенобиотики и их метаболиты биогенного и антропогенного происхождения.

Для оценки способности биогеоценоза к обезвреживанию ксенобиотиков следует учитывать два основных аспекта проблемы:

1. Наличие персистентных и неразлагающихся ксенобиотиков. Существуют неразлагающиеся типы поллютантов, например, тяжелые металлы, которые загрязняют пищевые цепи и могут накапливаться в тканях человека и высших животных. К этой группе загрязнителей также относятся радионуклиды с длительным сроком полураспада, например, трансурановые элементы. Ожидается, что спустя 30–40 лет в спектре радионуклидов загрязненных после аварии на Чернобыльской АЭС территорий на ведущие позиции выйдет америций.

2. Загрязнение биосферы продуктами распада поллютантов связано:

– с накоплением больших доз *продуктов распада ксенобиотиков*, когда скорость их поступления в экосистему превышает возможности биотической и абиотической трансформации; при этом могут появляться персистентные и вредоносные метаболиты, могут изменяться параметры среды (pH, pO_2, pCO_2 и др.), а также может изменяться соотношение, качественный и количественный состав организмов, участвующих в биодеградации ксенобиотиков;

– с *кумуляцией* или *биоаккумуляцией ксенобиотиков* (особенно липофильных веществ, металлов, радионуклидов) в живых организмах, что ведет к количественному и качественному ухудшению кормовой базы для организмов вышестоящих трофических уровней;

– с опасностью *накопления ксенобиотиков или продуктов их метаболизма в сублетальных концентрациях*, из-за возможности хронического отравления (падение репродуктивной способности), нарушения тонкой регуляции внутривидовых и межвидовых взаимодействий, нарушения равновесия конкурирующих видов из-за неодинаковой чувствительности видов к ксенобиотикам-поллютантам, увеличения плодовитости нежелательных видов (например, увеличение воспроизведения колорадского жука при обработке ДДТ, диэльдрином или паратионом), из-за синергичного негативного действия с другими ксенобиотиками.

Итак, мощь биохимических защитных механизмов биогеоценозов ограничена, поэтому необходим поиск альтернативных подходов для уменьшения загрязнения биосферы негативными ксенобиотиками и эффективному их обезвреживанию [9].

Репозиторий ВГУ

Г Л А В А 11. ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ И БИОГЕОЦЕНОЗЫ

Экологическая биохимия предназначена для понимания роли химических процессов, связанных с живыми организмами в поддержании жизнеспособности биогеоценозов.

11.1. Как уменьшить загрязнение биосферы

Для решения проблемы уменьшения загрязнения биосферы целесообразно рассмотреть следующие вопросы:

1. Необходимы адекватные методы оценки степени загрязненности биосферы, экологической опасности тех или иных ксенобиотиков, особенностей их биотрансформации.

2. Требуется замена экологически опасных ксенобиотиков, применяемых человеком (например, пестицидов) на экологически безопасные вещества, не способные нарушать равновесие в биогеоценозах при наличии активных антропогенных вмешательств.

3. Актуален поиск оптимальных способов ускорения деструкции поллютантов, попавших в биосферу и в особенности в водные экосистемы. Биотехнологическое значение могут иметь некоторые виды и штаммы микроорганизмов, способные к разрушению пестицидов, включая анионные и неионогенные, а также способные к деградации лигнина и других веществ. Делаются попытки введения в экосистему иммобилизованных ферментов, способных катализировать некоторые реакции биотрансформации избыточно накопившихся ксенобиотиков.

Получены положительные результаты в активизации бактериальной деструкции поллютантов путем использования явления кометаболизма нескольких штаммов бактерий или генномодифицированных бактерий, предназначенных для биотрансформации нескольких ксенобиотиков [9].

11.2. Экологически безопасные способы воздействия на виды, имеющие хозяйственное значение

Наиболее важным является предотвращение загрязнения биосферы пестицидами, которые весьма широко используются в сельском и лесном хозяйстве, а также для подавления численности нежелательных насекомых в жилищах, производственных помещениях, складах.

В настоящее время перспективны три следующих подхода.

1. Использование природных и искусственных экологических хеморегуляторов:

– феромоны, антифиданты, фагодетерренты, аналоги гормонов насекомых, антиовипозитанты и др.;

– аллелопатические вещества могут использоваться для подавления роста сорняков и ослабления давления фитогенных грибов;

Репозиторий ВГУ

– защитные вещества можно получать в промышленных масштабах (в биореакторах) путем культивирования клеток растений, резистентных к членистоногим и патогенам;

– для стимуляции и привлечения энтомофагов и акарифагов могут быть использованы кайромоны, а также синомоны и некоторые синтетические вещества, имитирующие действие кайромонов;

– в качестве альтернатив ядохимикатам могут быть использованы искусственно синтезированные вещества – функциональные аналоги природных хеморегуляторов (например, аналоги гормонов насекомых);

– получение хеморегуляторов методами генной инженерии (введение токсинов для насекомых в поедаемые насекомыми части растений, введение в растения генов устойчивости за счет синтеза бактерицидных белков (лизоцим);

– использование метаболитов гидробионтов, обладающих инсектицидным действием (нереистоксин).

2. Применение пропестицидов – нетоксичных или сравнительно малотоксичных веществ, которые под действием ферментов животных, растений или микроорганизмов превращаются в собственно пестициды (например, ингибиторы определенных функционально важных белков). К проинсектицидам относят метилкарбаматы, формамидины, фосфорамидотионаты, предшественники нереистоксина (картап, бензультап), сульфнильные производные арилметилкарбаминовой кислоты и карбофурана.

Перспективно использование способности насекомых деалкилировать стероидные молекулы растений – C_{29}-фитостеролы. Такая способность характерна только для членистоногих, а другие организмы от бактерий до млекопитающих удовлетворяют потребность в стероидах за счет их синтеза из мевалоната (насекомые не способны к синтезу стероидов из мевалоната). Учитывая это, были синтезированы 29-монофторстеролы, которые в организме насекомых в процессе деалкилирования высвобождали фторацетат. Фторцитрат превращается в α-фторцитрат, который ингибирует аконитатгидратазу или мембранный белок, участвующий в транспорте цитрата через мембрану. Этот тип проинсектицидов достаточно специфичен, поскольку деалкилировать фитостеролы могут только растительноядные насекомые (но не насекомые-зоофаги).

3. Интегрированная защита сельскохозяйственных растений означает рассмотрение поля как экосистемы, в которой есть свои механизмы регуляции; задачей человека является осторожное использование комплекса средств воздействия на эту экосистему с тем, чтобы сохранить ее структуру, а также функционирование регулирующих механизмов, и на этой основе сберечь доминирующий в экосистеме вид – выращиваемую сельскохозяйственную культуру. Этот способ защиты урожая базируется на данных экологической биохимии и подразумевает широкое использование природных биохимических механизмов поддержания численности членистоногих-вредителей и сорных растений, а также пропестицидов (или пестицидов целенаправленно и локально по времени, месту и количеству).

Перспективное значение имеет конструирование сортов растений, резистентных к определенным гербицидам. Резистентность обеспечивается на биохимическом уровне, например, за счет включения в геном таких генов, которые отвечают за наличие у растений ферментов, метаболизирующих и инактивирующих данный гербицид либо неингибируемых данным гербицидом [9].

Концептуально такие новые сорта (линии) растений напоминают эволюционно выработанные виды растений, резистентные к тем или иным токсинам грибов или аллелопатическим веществам других растений.

Репозиторий ВГУ

11.3. Биотестирование

В методический арсенал биохимической экологии входит совокупность методов, с помощью которых можно оценить биологическую активность рассматриваемых веществ биогеоценозов. Сюда входят различные способы биотестирования природных веществ, синтезированных человеком ксенобиотиков, а также загрязненных вод и других компонентов среды.

1. В 1927 г. Дж. Треван опубликовал работу об определении токсичности веществ с помощью $ЛД_{50}$ (выявление дозы вещества, при введении которой погибает 50% животных), для чего необходимо использовать 50–200 подопытных животных. В настоящее время этот метод подвергается критике из-за расхождений результатов в 5–10 раз и потребности в большом количестве подопытных животных (в мире свыше 100 млн в год).

2. В последние годы разрабатываются методы тестирования на стандартизированных культурах клеток с вычислением показателя CD_{50} (подсчет 50% погибших клеток). Эксперименты производят также на клетках бактерий, клеточных органеллах (митохондриях), липосомах и других модельных мембранных системах. Перспективно тестирование на растениях.

Растущее количество методов биотестирования требует разработки подходов к оценке их соотношения и соответствия:

1) результатов кратковременных и долговременных (хронических) воздействий веществ на тест-организм;

2) результатов тестирования одного вещества на нескольких биологических объектах;

3) результатов тестирования различных веществ на одном биологическом объекте;

4) результатов тестирований, проведенных по различным методикам.

Для количественного соотношения результатов двух различных опытов по биотестированию (например, тестирование разных ксенобиотиков) в некоторых случаях возможно использование формулы:

$$Усл.\ КК_{1,2} = [(R_1\text{-}R_1^{(E)}):R_1C_1] \times [(C_2R_2): [(R_2\text{-}R_2^{(E)})],$$

где Усл. $КК_{1,2}$ – условный коэффициент корреспондирования результатов биотестирования в экспериментах 1 и 2; R_1 – регистрируемый параметр (масса, объем, поглощение и др.) в контроле эксперимента 1; $R_1^{(E)}$ – регистрируемый параметр в условиях воздействия биологически активного вещества в эксперименте 1; C_1 – та концентрация биологически активного вещества в эксперименте 1, при которой состояние биотеста характеризовалось величиной $R_1^{(E)}$; C_2, R_2, $R_2^{(E)}$ – аналогично в эксперименте 2.

Если опыты 1 и 2 проводились (каждый) для набора концентраций, то концентрации C_1 и C_2 выбираются так, чтобы они были как можно ближе к EC_{50}. В идеальном случае, когда в каждом из опытов 1 и 2 удалось одну из концентраций взять равной EC_{50}, приведенная формула превращается в соотношение двух EC_{50}, что подтверждает ее состоятельность.

Указанная формула может использоваться для сравнения биотестирования двух веществ на одном тест-объекте, для сравнения действия одного и того же

Репозиторий ВГУ

вещества на два разных биообъекта, либо для сравнения эффектов одного вещества на один объект в разные моменты времени. Необходимо, чтобы C_1 и C_2 были выражены в одних и тех же единицах [9].

11.4. Закономерности эколого-биохимических взаимодействий в биосфере

Эколого-биохимические взаимодействия важны для формирования структуры энергетического и субстратного потоков через экосистемы, например, разделение потоков энергии и вещества на пастбищные и детритные трофические цепи. Для такого разделения необходимы две группы эколого-биохимических взаимодействий:

1) взаимодействия между высшими растениями и грибами (а также бактериальными патогенами), в которых участвуют токсины, ферменты грибов и патогенных бактерий, пре- и постинфекционные соединения растений;

2) взаимодействия между высшими растениями и фитофагами, в которых участвуют токсины растений, репелленты, антифиданты, аттрактанты, детерренты овипозиции, факторы, воздействующие на плодовитость и онтогенез фитофагов, а также другие экологические хемоэффекторы.

Соотношение эффективности этих двух групп взаимодействий регулирует, какая часть энергии и вещества, запасенных в первичной продукции, далее пойдет по детритному или пастбищному пути. Внутри пастбищного и детритного потоков энергии и вещества существует много конкретных трофических цепей, интенсивность энергетических и субстратных потоков, по которым также подвергается регуляции вышеназванными хеморегуляторами.

С позиций экологии можно выделить восемь главных функций химических веществ, участвующих в нетрофических взаимодействиях.

1. *Защита* от потенциального хищника, паразита (консумента) – отпугивание, сдерживание пищевой и репродуктивной активности, вызывание истощающей стресс-реакции, запрет поедания данного вида – потенциального объекта потребления. Воздействие таких защитных веществ направлено вверх по потенциальным трофическим цепям. К ним относят токсические или репеллентные вещества растений, фитоэкдизоны и другие вещества с гормональным действием, хемостерилянты, антиовипозитанты, антифиданты и др., а также «оборонительные» молекулы экскретов и токсины беспозвоночных и позвоночных животных. Это химические компоненты биохимических защитных реакций.

2. Биохимические процессы, обеспечивающие *агрессию* организмами высших трофических уровней во взаимодействиях с низшим трофическим уровнем. Таковы токсины и эктоферменты паразитических биотрофных грибов, патогенных бактерий, а также токсины хищных животных. Воздействия подобных веществ направлены по трофической сети вниз, на организмы нижнего трофического уровня.

3. *Сдерживание конкурентов* того же самого трофического уровня. Процесс сдерживания включает как биохимические механизмы агрессии, так и защиты. Эта функция присуща низшим растениям (фитопланктону), высшим растениям; может обнаруживаться в видоизмененном и сглаженном виде у животных

Репозиторий ВГУ

(например, мечение индивидуального участка пахнущими веществами). Считают, что большинство пестицидов, вносимых человеком в агроэкосистемы, выполняют сдерживающие функции (сдерживание членистоногих и патогенных грибов – конкурентов за растительные пищевые ресурсы). К этой группе хеморегуляторов относят аллелопатические агенты (растения), феромоны метки (животные), антибиотики, сидерофоры (грибы, прокариоты), бактериоцины (бактерии).

4. *Привлечение* (эту функцию выполняют аттрактанты). Сигнальные молекулы аттрактантного действия стимулируют пищевую, двигательную и репродуктивную деятельность. Эта функция проявляется во взаимодействии с организмами различных трофических уровней. К этой группе относят несколько групп хеморегуляторов, в том числе:

– феромоны и аттрактанты бактерий, грибов, водорослей, высших растений и животных;

– пищевые аттрактанты растений, воздействующие на животных фитофагов;

– аттрактанты растений, привлекающие животных-опылителей;

– вещества – кайромоны, выделяемые животными-жертвами и используемые их хищниками и паразитами для обнаружения жертв и ориентировки при их поиске.

– аттрактанты-приманки, используемые хищными грибами.

5. Регуляция *взаимодействий внутри популяции*, группы особей или семьи. К этой группе относят многие вещества, способные регулировать у позвоночных поведение, питание и репродуктивную деятельность. Химические вещества-регуляторы играют основную роль в поддержании структуры и функции колоний общественных насекомых. Например, к этой группе химических регуляторов относят:

– полифункциональные феромоны общественных насекомых;

– феромоны и другие сигнальные молекулы (позвоночные и некоторые беспозвоночные);

– сигнальные молекулы, определяющие специализированные функции членов сообществ насекомых.

6. Снабжение организмов *молекулами-предшественниками* для создания сигнальных молекул феромонов или гормонов, а также молекулами, которые используются воспринимающим организмом в готовом виде. Эти вещества-посредники (экологические хемомедиаторы) важны потому, что они происходят из организмов предыдущего трофического уровня. Это формирует устойчивые связи между организмами на основе формирования незаменимых для реализации биохимических процессов потоков субстратов. В результате формируется группировка видов, поддерживающих взаимное существование в экосистеме («экологический кластер»). К этой группе веществ относят пирролизидиновые алкалоиды – предшественники половых феромонов некоторых бабочек (растения); шоттенол – предшественник гормонов некоторых дрозофил (кактусы) и др.

7. Химические вещества, *формирующие среду обитания*, т.е. взаимосвязанные и взаимозависимые биохимические процессы у живых организмов экосистемы. Особенно рельефно роль экзометаболитов и эктоферментов видна у живых организмов, обитателей водных экосистем:

– выделяемые гидробионтами компоненты растворимого органического вещества (РОВ), в том числе органические вещества-антиоксиданты, а также химические вещества прооксидантного действия и пероксид водорода определяют прооксидантно-антиоксидантный потенциал водной экосистемы;

– окислительно-восстановительные условия, свободные радикалы, РОВ и эктоферменты определяют характер биохимических процессов в организмах водных систем на всех возможных трофических уровнях;

Репозиторий ВГУ

– прооксидантно-антиоксидантный баланс в водных экосистемах и во влажных почвах во многом определяют скорость окислительного разрушения РОВ и загрязняющих водоем органических веществ;

– на формирование прооксидантно-антиоксидантного баланса водных экосистем оказывают влияние хелататоры, комплексоны, связывающие важные ионы, например, металлы, включая микроэлементы;

– жизнедеятельность гидробионтов зависит от циркуляции воды в водоеме, зависящей от сезонных смен температуры. Отсутствие такой циркуляции, например, в экваториальных озерах вулканического происхождения может приводить к накоплению углекислоты в придонных слоях, а непредсказуемый массовый выброс накопившейся углекислоты является причиной смерти организмов в прибрежной зоне.

8. *Индикация подходящих для заселения, колонизации или размножения местообитаний*, ориентация в пространстве и формирование предпочтений при поиске местообитаний. Это одна из важнейших функций для всех подвижных организмов. Возможны следующие ситуации:

– оседание личинок гидробионтов и заселение ими новых субстратов и местообитаний. Химические вещества, выделяемые организмами – потенциальными субстратами либо другими организмами, могут индуцировать заселение данного субстрата либо, наоборот, служить репеллентом для личинок. Сюда относятся бактериальная пленка, организмы-деструкторы органического вещества, некоторые бентосные организмы;

– поиск мигрирующими в водной среде организмами (в том числе рыбами, морскими черепахами и млекопитающими) определенных участков акватории или побережья и эволюционное закрепление этого механизма в связи с восприятием физико-химических особенностей территории;

– ориентация в пространстве наземных позвоночных и беспозвоночных с использованием химического канала получения информации. Для реализации этого требуются сигнальные вещества, способствующие хемосенсорной ориентации перемещающихся животных, включая продукцию экзометаболитов и экскретов;

– химическое загрязнение биосферы нарушает многоуровневые биохимические взаимодействия между организмами в популяциях и экосистемах, маскирует оптимальные места обитания, изменяет ориентацию локомоции организмов;

– выбор среды обитания зависит от наличия условий биотрансформации вредоносных ксенобиотиков и организмов, обеспечивающих такую биотрансформацию. Для заселения территории принципиально важное значение имеет соотношение между скоростью поступления поллютантов в конкретные экосистемы и скоростью их деградации [9].

Итак, исследование механизмов внутривидовых и межвидовых взаимодействий необходимо для понимания проблемы экологического равновесия в биогеоценозах и биосфере. Эти механизмы формировались для поддержания равновесия в коэволюционно сложившихся экологических системах. Важную роль в формировании этих механизмов играл перенос генетической информации [9, 10, 18, 21, 29].

Репозиторий ВГУ

Г Л А В А 12. **ПЕРЕНОС ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ IN VIVO**

Молекулярная биотехнология сформировалась в последней трети XX века на основе технологии рекомбинантных ДНК и традиционной промышленной микробиологии. Эта наука основана на переносе единиц наследственности (генов) из одного организма в другой с помощью методов генетической инженерии [8, 14]. Целесообразно вначале рассмотреть возможности и механизмы переноса генов in vivo, т.е. в природных условиях.

12.1. Определения

Ген – основная физическая и функциональная единица наследственности, несущая информацию от одного поколения к другому. Ген представляет собой специфическую последовательность нуклеотидов в ДНК, а у некоторых вирусов – в РНК, детерминирующих или нуклеотидную последовательность транспортных РНК (тДНК), или рибосомных РНК (рДНК), или последовательность аминокислот в белках (структурные гены). Как правило, гены состоят из лидерной и трейлерной областей, между которыми находятся кодирующие (экзоны) и некодирующие (интроны) последовательности генов. Интронные последовательности чаще всего встречаются у эукариот.

Отметим, что трейлерной последовательностью называют последовательности нуклеотидов на 3′-конце эукариотических генов, которые не кодируют белок, а кодируют в иРНК 3′-нетранслируемую область. Лидерная последовательность – транскрибируемая часть эукариотического гена, следующая за кэп-сайтом и предшествующая стартовому кодону.

Любой ген, занимающий определенное место, или локус, на хромосоме, может мутировать в различные аллельные состояния, а также рекомбинировать с гомологичными генами. *Действие гена проявляется в фенотипе*. По выполняющим функциям гены подразделяют на 3 класса: а) структурные гены, которые транскрибируются на ДНК, а затем транслируются на рибосомах в полипептидные цепочки; б) структурные гены, которые транскрибируются в рРНК или тРНК; в) регуляторные гены, которые не транскрибируются, но служат сайтами узнавания для ферментов и других белков при репликации и транскрипции ДНК [5].

При обозначении гена и его белкового продукта с целью дифференцирования этих понятий в литературе принято обозначать *символ гена курсивом*, а символ соответствующего *белка – обычным шрифтом*. Например, символ «*CFTR*» обозначает ген муковисцидоза, а символ «CFTR» – соответствующий данному гену белок (нарушение

Репозиторий ВГУ

структуры его в результате мутаций вызывает развитие заболевания – муковисцидоз).

Генотип – это совокупность всех генов, локализованных в хромосомах организма, определяющая норму реакции особи на условия среды, ее жизнеспособность и плодовитость – в целом ее судьбу в генофонде следующего поколения вида или популяции. Процент особей с данным генотипом в генофонде следующего поколения – показатель адаптивности, или «дарвиновской приспособленности», генотипа. В более широком смысле генотип – это совокупность (система) всех наследственных задатков особи, наследственная основа организма, включающая в себя ядерных, а также неядерных – цитоплазматические (плазмон) и пластидные (пластом у растений) – носителей, в которой каждый ген находится в сложном взаимодействии с остальными ядерными генами и с плазмоном. Генофонд – это сложно взаимодействующая система наследственных задатков данной клетки или организма, включая аллели, характер их сцепления в хромосомах и наличие хромосомных перестроек [5].

Фенотип – совокупность всех внешних и внутренних структур и функций организма, которая может быть описана и изучена морфологическими, анатомическими и физиологическими методами. Фенотип формируется на основе генотипа в процессе индивидуального развития, является одним из вариантов нормы реакции организма на воздействие внешней среды и характеризуется изменчивостью. Фенотип – частный случай выражения генотипа, т. к. генотип никогда не может проявиться полностью. С позиций биохимии можно отметить, что в основе генотипа лежит ДНК, хранящая информацию, а основу фенотипа составляют белки, обеспечивающие реализацию этой информации [5].

Генетическая инженерия – наука о генетическом конструировании, направленном создании новых форм биологически активных ДНК и генетически новых форм клеток и целых организмов с помощью искусственных приемов переноса генов (технологии рекомбинантных ДНК, генетической трансформации, гибридизации клеток). *Генная инженерия* – раздел генетической инженерии, для которого характерен молекулярно-биологический уровень генетического конструирования, включающий технологию рекомбинантных молекул: выделение, конструирование и клонирование новых рекомбинантных генов, или молекул ДНК, создание банков генов и др. [5].

Клеточная инженерия – метод генетического конструирования клеток нового типа, включающий их культивирование *in vitro*, гибридизацию и реконструкцию путем слияния субклеточных структур (хлоропластов, митохондрий и др.), а также введения в клетки чужеродных органелл и др. С помощью клеточной инженерии удается соединять геномы разных видов (даже принадлежащих к различным царствам). Клеточная инженерия применяется для решения многих теоретических проблем биологии, а также в биотехнологии (например, использование гибридов для получения моноклональных антител, применяемых в медицине и других областях науки и производства) [5].

В.Н. Рыбчин (2002) рассматривает генетическую инженерию «не просто как набор методических подходов, но и как развитие генно-инженерных идей, позаимствованных у природы, … из природных молекулярно-генетических явлений, связанных с перемещением от-

Репозиторий ВГУ

дельных генов, их групп или сегментов». Эти явления он относит к «природной генетической инженерии» и указывает, что «они встречаются на разных иерархических уровнях – от генных сегментов до клеток», например:

– внутригенные перестройки генов иммуноглобулинов при дифференцировке лимфоцитов, что обусловливает образование разнообразных антител;

– транспозоны – подвижные генетические элементы, переносящие адаптивно полезные признаки и вызывающие внутригеномные перестройки;

– транслокация отдельных клеточных генов в вирусные геномы, что может придавать вирусам онкогенные свойства;

– перенос бактериальных генов плазмидами и фагами;

– сайт-специфические инверсии ДНК, контролирующие выражение генов и приводящие к изменению фенотипа клеток [8].

По В.Н. Рыбчину, в генетической инженерии следует выделять генную и геномную инженерию (табл. 12.1) [8].

Основными объектами генно-инженерных операций являются гены. В генетической инженерии чаще манипулируют генами, кодирующими пептиды и белки. Информация, содержащаяся в генах, записана в виде генетического кода. У всех организмов, за исключением некоторых кодонов у ресничных простейших и в митохондриях, генетический код одинаков. Общие принципы реализации генетической информации однотипны у всех клеток:

– в структуре гена запрограммированы два основных этапа его экспрессии (транскрипции и трансляции); на этапе транскрипции с помощью РНК-полимеразы синтезируется иРНК, а на этапе трансляции осуществляется синтез полипептидной цепи (пептида, белка);

– нуклеотидные последовательности, благодаря которым РНК-полимераза связывается с ДНК (промоторы) и отсоединяется от нее (терминаторы транскрипции), располагаются в начале и конце генов соответственно;

– генетические сигналы, обусловливающие трансляцию, также заложены в структуре генов в виде инициирующих и терминирующих кодонов.

Несмотря на общность принципов реализации генетической информации у всех организмов, структура генов и их регуляторных элементов, а также строение аппаратов транскрипции и трансляции у про- и эукариот существенно различаются (табл. 12.2) [8].

Репозиторий ВГУ

Таблица 12.1 – Разделы генетической инженерии

Генная инженерия			
Содержание	Этапы	«Инструментарий»	Методы переноса генов
Конструирование организмов с несвойственными данному виду признаками	*In vivo*: извлечение генов, их перенос и закрепление в новом генетическом окружении, экспрессия генов *In vitro*: синтез или выделение генов; модификация генов, замена промоторов и терминаторов, локализованный мутагенез; присоединение генов к векторным молекулам; введение генов в клетки, их клонирование и экспрессия	Вирусы, плазмиды и транспозоны Рестриктазы и другие нуклеазы, ДНК-лигазы, обратная транскриптаза и другие ДНК- и РНК-полимеразы. Векторы, адаптеры, полилинкеры, зонды и др.	Трансдукция, конъюгация, транспозиция, слияние протопластов Трансформация (химическая, электропорация, применение ускоренных частиц, липосом), микроинъекции в ядра эукариотических клеток
Геномная инженерия			
Содержание	Объект	Методы конструирования	
Конструирование организмов новых видов	Вирусы Клетки прокариот Клетки эукариот	Рекомбинация in vivo и in vitro Межвидовая конъюгация и слияние протопластов. Слияние растительных протопластов и животных клеток, введение в клетки изолированных метафазных хромосом, микроинъекция хромосом в ядра, перенос изолированных митохондрий и хлоропластов	

Таблица 12.2 – Характеристика генетического аппарата про- и эукариот (по В.Н. Рыбчину, 2002, с дополнениями)

Элементы аппарата	Прокариоты	Эукариоты
Гены		
Строение	Обычно непрерывны	Обычно содержат интроны
Стабильность	Стабильны	Возможны перестройки
Координация экспрессии	Гены, выполняющие общую функцию, сгруппированы в опероны (регулоны)	Оперонов нет. У индуцибельных генов имеются регуляторные элементы. Отмечается тканеспецифичность энхансеров

Репозиторий ВГУ

Окончание табл. 12.2

Элементы аппарата	Прокариоты	Эукариоты
Транскрипция		
Число РНК-полимераз	Одна, распознает промотор с помощью σ-субъединицы	Три, распознают промотор с помощью транскрипционных факторов
Промоторы	Единый план строения, наличие двух консервативных последовательностей: у *E.coli* TATAAT (-10) и TTGACA (-35)	Промоторы генов, кодирующих белки, имеют одну консервативную TATA-последовательность, а также мозаичный набор из разных боксов. У высших эукариот: CAAT, GC, октамер ATTTGCAT и др.
Терминатор транскрипции	GC-богатая шпилька в иРНК и затем последовательность из уридиновых остатков. Иногда зависит от факторов терминации	Сайт AAUAAA в конце иРНК является сигналом для отщепления концевой части транскрипта и полиаденилирования иРНК
иРНК	Коллинеарна гену или оперону	Первичный транскрипт коллинеарен гену, на 5′-конце находится 7-метилгуанозин, а на 3′-конце – полиадениловая цепочка. «Зрелая» иРНК образуется в процессе сплайсинга. Возможны варианты за счет альтернативного сплайсинга
Трансляция		
Рибосомы	70S (50S+30S), м.м. 2700 кДа	80S (60S+40S), м.м. 4200 кДа
Сайт связывания рибосом	Последовательность с ядром AGGA и первые кодоны гена	Посадка малой субъединицы опосредована кэп-сайтом. Сборка целой рибосомы происходит на сайте GCC(A/G)CCAUGG, включающем инициирующий кодон
Инициирующие кодоны	AUG, изредка GUG или UUG	AUG
Терминирующие кодоны	UAG, UAA, UGA	UAG, UAA, UGA
Сравнение транскрипции и трансляции		
Связь процессов	Оба процесса строго взаимосвязаны	Оба процесса разделены мембранами
Судьба первичного транскрипта	Первичный транскрипт иРНК используется как матрица для синтеза полипептидной цепи	Предшественник иРНК подвергается процессингу в ядре перед транспортом в цитозоль, где происходит синтез полипептидной цепи

Примечание: в скобках через косую черту указаны альтернативные нуклеотидные остатки.

Репозиторий ВГУ

12.2. Регуляция экспрессии генов у прокариот и эукариот in vivo

Механизмы репликации, транскрипции и трансляции рассматривались студентами при изучении биохимии. Данный раздел пособия предназначен для углубления представлений о природных механизмах регуляции генов у прокариот и эукариот.

Регуляция экспрессии генов **прокариот** осуществляется в основном на уровне транскрипции с помощью *регуляторных белков*. Регулируемые гены содержат рядом с промотором специфические нуклеотидные последовательности, способные связывать регуляторные белки. Регуляция может быть негативной (осуществляется белками-репрессорами) или позитивной (осуществляется белками-активаторами). Белки-регуляторы синтезируются активными или активируются после присоединения к ним определенных для каждого гена низкомолекулярных веществ. Если появление в клетке такого вещества приводит к инициации транскрипции, то его называют *индуктором*, а сам ген – индуцируемым; если при появлении вещества транскрипция отключается, то вещество называют *корепрессором*, а ген – репрессируемым.

При *негативной регуляции* перед геном, перекрываясь с промотором, расположен оператор, предназначенный для связывания молекул репрессора. В случае неактивного состояния репрессора РНК-полимераза может связываться с промотором и осуществлять транскрипцию. Активный репрессор своим связыванием с оператором мешает присоединению РНК-полимеразы к промотору, препятствуя тем самым включению процесса транскрипции, а следовательно, и экспрессии гена. В случае *позитивной регуляции* регуляторная последовательность, с которой связывается активатор, примыкает к промотору. В этом случае соединение РНК-полимеразы с промотором возможно только после ее контакта на ДНК с активатором.

У некоторых генов имеются дополнительные промоторы (1–2 или более), один из которых обеспечивает базальный уровень экспрессии гена, а транскрипция с другого начинается при появлении в клетке определенных (сигнальных, эффекторных) молекул.

При совместном выполнении несколькими белками определенной функции (например, цепь ферментов метаболизма лактозы) кодирующие их гены составляют группу с координированной экспрессией. Если входящие в такую группу гены располагаются рядом, то группу называют *опероном*, если в разных местах – *регулоном*. Координация экспрессии генов в оперонах или регулонах достигается одновременным включением или выключением транскрипции этих генов. Например, лактозный оперон состоит из трех генов (*lacZ, lacY, lacA),* продукты которых (β-галактозидаза, β-галактозидпермеаза и

Репозиторий ВГУ

β-галактозидтрансацетилаза) необходимы для использования лактозы в качестве источника углерода. Оперон имеет один промотор и перекрывающийся с ним оператор, а также один основной терминатор транскрипции, поэтому все входящие в него гены транскрибируются в одну полигенную молекулу иРНК. По ее матрице одновременно синтезируются все три белка-фермента, так как каждый входящий в нее ген обладает собственным сайтом связывания рибосом. Одновременно может прекращаться экспрессия всех трех генов оперона путем связывания репрессора с оператором. Регуляция экспрессии оперонов, обеспечивающих синтез низкомолекулярных веществ (например, аминокислот), обычно осуществляется конечными продуктами, которые являются корепрессорами. По достижении определенной концентрации эти продукты объединяются с молекулами репрессоров, способствуя тем самым их связыванию с операторами и блокированию транскрипции оперонов. Чаще опероны и многие гены функционируют и регулируются независимо друг от друга. Поэтому, меняя их локализацию в геноме или перенося в другие клетки, можно добиваться их экспрессии.

Отличительной особенностью генов **эукариот** является прерывность, т.е. чередование в них последовательностей нуклеотидов, которые представлены (экзоны) или не представлены (интроны) в зрелой иРНК. Интроны – это не кодирующие последовательности, которые располагаются как в области ДНК, ограниченной инициирующим и терминирующим кодонами, так и за пределами гена. Прерывные гены у низших эукариот (дрожжи) составляют около 5%, а у млекопитающих – до 94%. Справедливости ради отметим, что мозаичность генов найдена и у прокариот. Эволюционно связанные гены, обладающие высокой степенью гомологии, образуют семейства. Характерной чертой генов, входящих в семейство, является сходная картина локализации большинства интронов.

Гены эукариот не группируются в опероны, поэтому каждый из них имеет собственные промотор и терминатор транскрипции. Транскрипцию ведут РНК-полимеразы I, II и III, которые синтезируют рРНК, иРНК и тРНК, соответственно. Рассмотрим механизм экспрессии генов, кодирующих белки. РНК-полимераза II состоит из более десятка субъединиц, но не может связываться непосредственно с промотором. Ее связыванию с промотором способствуют транскрипционные факторы белковой природы. Длина типичного эукариотического промотора около 100 п.н. (пар нуклеотидов). В нем различают две части – базовую и дополнительную. Гены, имеющие только базовую часть промотора, функционируют в любых клетках организма и не подвержены тканеспецифическому контролю. Эта часть служит для инициации транскрипции и точной ориентации РНК-полимеразы II относительно первого транскрибируемого нуклеотида. Дополнитель-

Репозиторий ВГУ

ная часть совместно с энхансерами (усилителями) используется для повышения эффективности транскрипции и регуляции активности гена. Энхансеры способны увеличивать эффективность транскрипции ближайшего гена в десятки и сотни раз. Энхансер может располагаться с любой стороны гена, внутри его (в интроне) и даже на расстоянии в несколько тысяч пар нуклеотидов. Различают *индуцибельные энхансеры*, которые реагируют на изменения в окружающей среде – тепловой шок, появление тяжелых металлов, ростовых факторов, сигнальных молекул и др., а также *тканеспецифичные* и временные энхансеры, активные только в определенных клетках в определенный период онтогенеза. Уменьшение транскрипционной активности РНК-полимеразы II вызывают сайленсеры (успокоители). Таким образом, механизм регуляции транскрипции у эукариот более гибкий, чем у прокариот. Это имеет важное значение для понимания биохимических механизмов существования организмов в различных экологических ситуациях, рассмотренных в предшествующих разделах пособия.

У эукариот матричную роль РНК выполняет только в цитоплазме. Перед перемещением из ядра в цитоплазму предшественник иРНК подвергается *сплайсингу*. Размер типичного гена млекопитающих составляет 15–17 т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов, или kb; kb – kilobases, т.е. тысяча пар оснований) и ему соответствует длина ядерной РНК (пре-иРНК), а размер иРНК – меньше примерно в 5 раз. Такое укорочение достигается путем удаления интронов из пре-иРНК с помощью малых ядерных РНК и многокомпонентного комплекса факторов сплайсинга (*SF*). Сплайсинг служит для формирования непрерывной белок-кодирующей последовательности нуклеотидов иРНК и осуществляется с помощью сплайсосомы.

Сплайсосома (сплайсеосома, сплайсинговый комплекс) – многокомпонентный комплекс факторов сплайсинга (*SF*) и малых ядерных РНК (мяРНК), катализирующих сплайсинг ядерных предшественников РНК (пре-РНК), в результате чего образуется зрелая иРНК у эукариот. Сплайсинг пре-иРНК в митохондриях и хлоропластах осуществляется аутокаталитически самой пре-иРНК [5].

Можно согласиться с В.Н. Рыбчиным, что «сплайсинг – один из ярких примеров генной инженерии, осуществляемой природой». В некоторых генах, имеющих несколько интронов, возможен альтернативный сплайсинг, что приводит к синтезу белковых изоформ – различных пептидов, закодированных одним геном.

Соединение белок-кодирующих сегментов из прерывных генов может происходить и на уровне ДНК. Это один из механизмов необратимой дифференцировки клеток. Так, например, формируются гены иммуноглобулинов у позвоночных. Синтез десятков миллионов разнообразных иммуноглобулинов реализуется путем образования генов легких и тяжелых цепей из комбинаций нескольких тысяч определенных генных сегментов. В этот процесс равный вклад вносят внутримолекулярные сайт-специфические рекомбинации между генными сегментами на уровне ДНК и сплайсинг [8].

Репозиторий ВГУ

12.3. Подвижные генетические элементы

Фундаментальным свойством геномов является стабильность, что позволяет сохранять видовые особенности организмов в течение миллионов лет. Но известен *горизонтальный перенос генов* – эволюционно закрепленный механизм передачи генов не от родителей потомкам, а от одновременно существующих организмов друг другу. Уникальный пример его действия – передача гена одной из изоформ супероксидодисмутазы от окунеобразной рыбы из семейства *Leiognathidae* в митохондриальный геном ее биолюминесцирующего симбионта *Photobacter leiognathi*. Горизонтальная передача – перенос ДНК: а) от индивидуальной клетки или организма в другие клетку или организм того же вида с помощью механизма, отличающегося от митоза или мейоза; б) от вируса в клетку или организм; в) от бактерии в клетку или организм (например, от бактерии в растение) [5]. Горизонтальный перенос генов осуществляется подвижными генетическими элементами, плазмидами и вирусами. Он приводит к локальным изменениям в индивидуальных геномах.

12.3.1. Транспозоны

Подвижные генетические элементы встречаются в ДНК практически всех организмов. Они представляют собой сегменты ДНК, способные к внутри- или межхромосомным перемещениям. У большинства из них центральная часть, содержащая информацию о механизме перемещения, фланкирована (ограничена) инвертированными повторами нуклеотидов. Такая структура получила название транспозонной, а сами подвижные генетические элементы называют *транспозонами*. Характерной чертой транспозонов бактерий является ограничение их с обоих концов прямыми повторами реципиентной ДНК (ДНК-мишени).

Инвертированные повторы – два участка (копии) одной и той же двуцепочечной ДНК, имеющие одинаковые нуклеотидные последовательности, но расположенные в противоположной (обратной) ориентации, например:

5^1...*AGAGAGC*.....*CGAGAGA*....3^1

3^1...*TCTCTCG*..... *GCTCTCT*... .5^1

Такие инвертированные повторы содержат палиндромы и сайты-мишени для различных белков, связывающихся с ДНК. Инвертированные терминальные повторы – короткие родственные или идентичные последовательности, ориентированные в противоположных направлениях и расположенные на концах некоторых транспозонов.

Прямые повторы – идентичные или почти идентичные последовательности ДНК, присутствующие в двух и больше копиях в той же ориентации и на той же самой нити ДНК. Например:

5^1 *AGTCA* ..... *AGTCA* 3^1

3^1 *TCAGT* ..... *TCAGT* 5^1

Такие повторы могут следовать один за другим или находиться в разных участках молекулы ДНК [5].

Репозиторий ВГУ

Транспозоны кодируют *ферменты*, которые обеспечивают вырезание их из исходного сайта, а также перенос и инсерцию (вставку) в новый сайт. Процесс вырезания транспозона из его исходного сайта, перенос и интеграция в другой сайт реципиентной ДНК называется *транспозиция*. В процессе транспозиции участвуют ферменты транспозаза (катализирует вырезание, перенос и инсерцию транспозонного элемента) и резолваза (катализирует сайт-специфическую рекомбинацию по специфическим последовательностям нуклеотидов между двумя транспозонами, входящими в коинтегративную структуру). Известны два разных механизма транспозиции: 1) при репликативной транспозиции одна копия транспозона передается в реципиентную ДНК, а другая сохраняется в исходном (донорном) сайте; 2) при нерепликативной транспозиции транспозон обнаруживается только в реципиентной ДНК. Эти механизмы транспозиции описывают перемещения подвижных генетических элементов главным образом *внутри одной клетки*. Но благодаря такому переносу *данные гены могут включаться в плазмиды* и вместе с ними распространяться в популяциях клеток разных видов, изменяя их способность к выживанию в неблагоприятных условиях. На рубеже 90-х годов прошлого века были описаны *конъюгативные транспозоны* (длиной до 100 т.п.н.), способные передаваться из клетки в клетку. Наряду с генами транспозиции они содержат *tra*-оперон (информацию о способе конъюгации в процессе прямого контакта клеток при передаче генетической информации). Все они обладают широким спектром хозяев и способны к транспозиции в грамположительных и грамотрицательных клетках. В этих же клетках они экспрессируют имеющуюся в них детерминанту устойчивости к антибиотикам и другим антиметаболитам.

Известно большое количество различных эукариотических транспозонов (*P*-элемент дрозофилы, *Ty*-элемент дрожжей, транспозибельные элементы кукурузы и др.). Считают, что подвижные генетические элементы эукариот могут перемещаться в виде ДНК как бактериальные транспозоны или в виде РНК как ретровирусы. В соответствии с этим эукариотические транспозоны подразделяют на *классические транспозоны* и *ретротранспозоны*.

Биологическая роль транспозонов определяется способностью индуцировать геномные перестройки и мутации, а также переносить гены. Для *экологической биохимии* важен факт реакции некоторых транспозонов на стрессовые для клетки воздействия, способствующей их совместной выживаемости. Например, частота транспозиции транспозона Tn501 существенно увеличивается при наличии в среде ртути, а транспозона Tn551 – в присутствии эритромицина. Отмечено увеличение частоты транспозиции ретротранспозона Ty при обработке дрожжевых клеток определенными мутагенами. Существует мне-

Репозиторий ВГУ

ние, что транспозоны являются агентами, осуществляющими связь между геномами всех организмов.

Итак, в природной генной инженерии важную роль играют мобильные последовательности ДНК бактерий, бактериофагов или плазмид, фланкированные концевыми повторяющимися последовательностями и имеющими типичные гены для осуществления транспозиции (транспозаза, резолваза). Транспозоны могут интегрироваться друг в друга, образуя рекомбинантные мобильные элементы. Транспозоны встраиваются в плазмиды или хромосомы случайно и независимо от рекомбинационной системы клетки-хозяина. Они нашли применение при конструирования векторов клонирования.

12.3.2. Плазмиды

Плазмида – экстрахромосомный (внехромосомный) генетический элемент, закрытая, кольцевая, автономно реплицирующаяся дуплексная молекула ДНК, имеющая размеры от 1 до 200 и более т.п.н. и от одной до нескольких сот копий на бактериальную клетку. Число копий плазмид может зависеть от факторов среды. *Конъюгативные плазмиды имеют набор генов, обеспечивающих их перенос в другие клетки*. Существуют криптические плазмиды с неизвестным генотипом и биологическими функциями. Плазмиды входят также в состав митохондрий и пластид эукариотических организмов. Бактериальные плазмиды широко используются для конструирования векторов клонирования [5]. Благодаря кольцевой структуре плазмиды не подвергаются действию экзонуклеаз. Известны также линейные плазмиды, устойчивость которых к действию экзонуклеаз обеспечивается тем, что концы полинуклеотидных цепочек их ДНК защищены белками или соединяются ковалентно.

Основным свойством плазмид является способность к автономной репликации. Молекулы ДНК приобретают ее в том случае, если в них имеется сайт начала репликации – *ori* – и, как правило, набор генов, необходимых для осуществления репликации. Такие молекулы получили название *репликонов*. Хромосомы прокариотических клеток содержат по одному *ori*-сайту, а плазмидные ДНК могут иметь по несколько *ori*-сайтов. Кольцевые плазмиды грамотрицательных бактерий реплицируются однонаправлено в тета-форме («закрытое кольцо»), а грамположительных – в сигма-форме («катящееся кольцо»).

Многие плазмиды способны передавать свою копию в другие клетки методом конъюгации.

Конъюгация бактерий – форма полового размножения у бактерий, при котором происходит передача сцепленных с *F*-фактором генов, сопровождающаяся их рекомбинацией, от «мужской» F^+-клетки, содержащей *F*-половой фактор, к «женской» F^--клетке, т.е. ДНК передается от донорной клетки в реципиентную в результате прямого контакта между ними. F^--штамм, женская бактериальная клетка, – бактериальная клетка, не содержащая половой *F*-фактор, которая участвует в конъюгации бактерий как реципиент, т.е. принимает генетический материал мужских штаммов. Только в клетках F^--штамма происходят рекомбинации

Репозиторий ВГУ

хромосом. *Под* F^+-штаммом, мужской бактериальной клеткой, понимают бактериальную клетку, несущую *F*-фактор, который выполняет половые функции и участвует в процессе конъюгации бактерий в качестве донора генетического материала. В F^+-штамме никогда не происходит рекомбинаций [5].

Такие плазмиды называют конъюгативными, или трансмиссибельными. В своем геноме они содержат оперон *tra* (см. выше конъюгативные транспозоны). Этот оперон обеспечивает образование конъюгационного мостика между клетками, по которому может переноситься одна из полинуклеотидных цепей плазмидной или бактериальной ДНК. Он способен также вызывать появление у клеток пилей (волосков) определенного типа, с помощью которых адсорбируются специфические фаги. Многие неконъюгативные плазмиды обладают свойством мобилизации, т.е. способностью переноситься в другие клетки с помощью конъюгативной плазмиды. Кроме того, наличие транспозонов в плазмидах способствует их объединению друг с другом с образованием *коинтеграторов*. Неконъюгативная плазмида может быть перенесена в другую клетку в составе коинтеграта с конъюгированной плазмидой. Коинтеграты распадаются в реципиентных клетках на исходные репликоны, которые продолжают автономное существование.

У эукариот основную долю внехромосомной ДНК составляют ДНК органелл. Плазмиды найдены у низших эукариот – дрожжей, простейших и грибов, а также у некоторых высших растений. Они могут локализоваться в ядре или в митохондриях. При электронно-микроскопическом исследовании препарата общей дрожжевой ДНК была обнаружена кольцевая ДНК длиной около 2 мкм, которая получила название 2μ-ДНК или *Scp*1. Дальнейшие исследования показали, что большинство лабораторных штаммов *Saccharomyces cerevisiae* содержат такие плазмиды в количестве 1–5% от суммарной ДНК клетки. Эти плазмиды не кодируют жизненно важных функций клетки и локализованы в ядре дрожжей, но не обнаруживаются в хромосомной ДНК в интегрированном виде. Репликация плазмид происходит в S-фазе клеточного цикла. Обнаружено, что в ядре клеток дрожжей *S. cerevisiae* находится также небольшое количество кольцевой ДНК с контурной длиной около 3 мкм, которая автономно реплицируется (гены рРНК).

Плазмиды в мире микроорганизмов играют роль своеобразных посредников (векторов) при межклеточном обмене генами. Они обычно придают селективные преимущества клетке хозяина. Перенос генов с помощью конъюгативных плазмид между различными видами и родами бактерий способствует адаптации клеток к изменяющимся условиям. Плазмиды придают клеткам различные фенотипические признаки (в том числе и рассматриваемые в рамках экологической биохимии). К таким признакам относят устойчивость к антибиотикам (описана устойчивость к более чем 20 различным антибиотикам), к катионам (свинца, ртути, кобальта, висмута, кадмия и др.), к анионам

Репозиторий ВГУ

(арсениту, арсенату), к мутагенам физической (ультрафиолет) и химической (акридины, этидиум-бромид) природы, бактериоцинам. Клетки с различными плазмидами способны:

– вызывать биодеградацию камфоры, ксилола, нафталина, n-алканов, салицилата, толуола;

– синтезировать антибиотики, бактериоцины, гемолизин, инсектициды, пигменты, поверхностные антигены, сероводород, токсины;

– использовать в качестве источника углерода различные сахара и необычные аминокислоты;

– конъюгировать с реципиентными штаммами бактерий;

– индуцировать опухоли у растений;

– осуществлять рестрикцию и модификацию ДНК.

В последние годы пристальное внимание исследователей приковано к госпитальным инфекциям, вызванным появлением штаммов-возбудителей заболеваний, устойчивых к антибактериальным препаратам. В то же время в местах скопления промышленных отходов и ядов обнаружены микроорганизмы, нашедшие здесь для себя экологическую нишу. Отметим также роль плазмид в смене белков внешней мембраны клеток, что приводит к их антигенной вариации и способствует повышению устойчивости бактерий против иммунной системы животных.

12.3.3. Фаги

Перенос клеточных генов с помощью вирусов широко распространен в природе и называется *трансдукцией*.

Трансдукция – перенос ДНК из одной бактерии (донорной клетки) в другую (реципиентная клетка) с помощью умеренных или вирулентных бактериофагов в качестве вектора. Напомним, что *вектор* (переносчик) определяется как: 1. Молекула ДНК, способная к автономной репликации и включению в себя чужеродной ДНК. Является инструментом генной инженерии, обеспечивающим доставку (перенос) генетической информации в клетку-реципиент и ее клонирование. 2. Организм (например, малярийный комар, вши и т. п.), переносящий паразитов с одного хозяина на другого. Полная или рекомбинантная трансдукция ведет к ковалентной интеграции донорной ДНК в акцепторную ДНК. Существуют два варианта полной трансдукции: а) неспецифическая или генерализованная трансдукция – фаг может интегрировать в любое место хозяйской хромосомы, и поэтому почти любой ген может быть включен в трансдуцирующий фаг и затем перенесен в реципиентную бактерию; б) специализированная ограниченная трансдукция – фаг может интегрировать только в какие-либо специфические места хромосомы хозяина, и поэтому только ген(ы) хозяина, расположенный рядом с этим местом, может быть включен в трансдуцирующий фаг и, следовательно, перенесен в реципиентную бактерию. Трансдуцирующие фаги являются дефектными, поскольку часть их генома замещается трансдуцируемой ДНК и может реплицироваться в реципиентной клетке, но только в том случае, если имеется комплементирующий фаг-помощник дикого типа [5].

Плазмиды и фаги играют фундаментальную роль в эволюции бактерий, содействуя горизонтальному переносу генетических моду-

Репозиторий ВГУ

лей, кодирующих самые разнообразные функции. Природа использует их в качестве своеобразных векторов для своих генноинженерных целей. Паразитические и/или симбиотические взаимодействия этих автономно реплицирующихся генетических элементов между собой, а также со своими хозяевами способствовали быстрой и многосторонней эволюции молекулярных адаптивных механизмов. Наиболее интересными объектами являются *фазмиды*. Это умеренные фаги, профаг которых находится в плазмидном состоянии. В лизогенном состоянии фазмида ведет себя как плазмида, а при литическом развитии – как вирус [8].

12.4. Перенос генов между видами

Для реализации горизонтального переноса генов необходимо, чтобы генетический материал преодолел два барьера – 1) барьер для проникновения чужеродной ДНК (чужДНК) в клетку и 2) барьер для ее наследования.

Первый барьер преодолевается проще, чем второй. Экспериментально установлено, что перенос генов между грамотрицательными и грамположительными бактериями, а также от эубактерий в растения и грибы осуществляется способом конъюгации.

Перенос генов в эубактерии возможен (но строго не доказан) методом *трансформации*.

Трансформация – перенос генетической информации в бактериальные клетки при помощи изолированной ДНК с участием или без участия плазмид, но всегда без участия вирусов. Бактерия, находящаяся в таком физиологическом состоянии, когда она может воспринимать экзогенные молекулы ДНК (быть реципиентом ДНК при трансформации) называется компетентной. *Компетентность*, компетенция – физиологическое состояние клеток, определяющее способность воспринимать трансформирующую ДНК [5]. Для некоторых родов бактерий (*Bacillus, Haemophilus, Pseudomonas, Streptococcus, Streptomyces* и др.) состояние компетентности естественно. Например, *B. subtilis* легко трансформируются гомолологичной бактериальной ДНК. Добавленная двуцепочечная ДНК адсорбируется на поверхности компетентных клеток и под действием нуклеаз превращается в одноцепочечные фрагменты. В клетки проникает одноцепочечная ДНК размером около 10^4 нуклеотидов, которая путем рекомбинации замещает одноцепочечный гомологичный участок хромосомной ДНК, при этом почти каждый поглощенный фрагмент ДНК интегрируется в хромосому. Частота трансформации линейно зависит от концентрации добавляемой ДНК в определенных ее пределах. Это свидетельствует о том, что одной молекулы ДНК достаточно для успешной трансформации клетки. В генной инженерии *in vitro* компетентность вызывают искусственно. Наиболее распространены обработка клеток двухвалентными катионами «на холоду» и электропорация (пробой клеточной стенки электрическим током). Известно также, что последовательные циклы замораживания и оттаивания ослабляют клеточную стенку и делают ее проницаемой для вхождения ДНК в клетку. Можно трансформировать бактериальные протопласты или сферопласты, добавляя к ним в присутствии полиэтиленгликоля изолированную ДНК или ДНК, включенную в липосомы [8].

Репозиторий ВГУ

Доля компетентных клеток в популяции составляет максимально 15%. Компетенция зависит от физиологического состояния клетки. Она наиболее высока в середине фазы экспоненциального роста, а затем быстро снижается до минимума. Полагают, что поверхность клетки изменяется на протяжении роста, и ДНК может поглощаться только в определенную, относительно короткую фазу [2–6].

В процессе преодоления барьера для наследования имеются следующие трудности:

1. Проблема рестрикции – в бактериях после проникновения чужДНК гидролизуется с помощью специфических эндонуклеаз–рестриктаз. Рестриктазы связываются с двуцепочечными молекулами ДНК в определенных участках (сайты узнавания) и расщепляют их на фрагменты (рестрикты). Собственную ДНК они не разрушают, поскольку ее сайты узнавания модифицируются (метилируются) специфическими метилазами. Ферменты рестрикции и модификации найдены практически у всех исследованных бактерий. Они могут кодироваться также фагами и плазмидами.

2. Проблема репликации – стабильное наследование чужДНК, избежавшей гидролиза рестриктазами, маловероятно.

3. Проблема рекомбинации – коррекция неспаренных оснований в гетеродуплексах при взаимодействии не полностью гомологичных ДНК. Это одно из препятствий для межвидового обмена генетическим материалом.

4. Проблема транскрипции – экспрессия гена возможна лишь в том случае, если будет случайная интеграция рядом с промотором ДНК реципиентных клеток. Пока достоверно установлено только функционирование генов антибиотикоустойчивости со своими промоторами при их переносе из грамположительных бактерий в грамотрицательные.

5. Проблема кодонов – из-за вырожденности генетического кода одна и та же аминокислота может кодироваться несколькими кодонами, и зачастую ей соответствуют несколько изоакцепторных тРНК. Частоты встречаемости разных тРНК в клетках различных организмов неодинаковы. Это является определенным препятствием для трансляции в случае переноса генов между отдаленными видами и тем более царствами, поскольку в реципиентных клетках для некоторых кодонов чужеродного гена может не хватать тРНК.

Таким образом, процессы конъюгации, трансдукции и трансформации могут лежать в основе горизонтального переноса генетического материала между живыми организмами (клетками) в природных условиях. В результате такого переноса генетической информации возникают изменения генотипа и фенотипа организмов (клеток), что лежит в основе *изменчивости*.

Репозиторий ВГУ

Изменчивостью называют: 1. Существование организмов в различных формах и вариантах, которые не могут быть описаны такими различиями, как возраст, пол, роль в жизненном цикле, одномоментное разнообразие генотипов и фенотипов (всех признаков и свойств) у отдельных особей и в группах любой степени родства (обычно внутри популяции и вида). 2. Способность организмов реагировать на воздействия факторов среды морфофизиологическими изменениями. 3. Характеристика степени изменения организмов какой-либо систематической группы в ходе эволюции. По этому показателю различают множество форм изменчивости, важнейшие из которых:

– наследственная (генотипическая) – обусловлена возникновением мутаций и их комбинациями при скрещивании;

– ненаследственная (модификационная, паратипическая) – вызывается внешними условиями и жестко не закрепляется в генотипе;

– онтогенетическая – перемены в индивидуальном развитии организма (морфогенезе) или при дифференциации клеток и др.

Фактически все явления изменчивости направлены факторами внешней среды и ограничены ранее сложившимися внутренними структурами и процессами, но принято считать, что *норма реакции* организма, передаваемая по наследству, на действие какого-либо фактора может быть естественно усилена какими-то внешними направляющими воздействиями (например, такое усиление достигается специальными приемами при искусственном отборе). Нормой реакции называют наследственно закрепленные пределы модификационной изменчивости у конкретного организма, проявляемой при колебаниях условий окружающей среды (природных, в эксперименте, при культивировании). Необходимо также вспомнить определение «*генотипа норма реакции*», под которым понимают размах (границы) изменчивости признака и/или степени его выражения под влиянием изменяющихся условий окружающей среды, которая контролируется генотипом. Степень соответствия между организмом и средой, т.е. приспособленность, зависит от *адаптивной нормы*. Адаптивной нормой называют генетическую структуру конкретной популяции любого вида, обеспечивающую ее конкурентоспособность в данных условиях обитания. Таким образом, изменчивость – это всеобщее свойство организмов, один из ведущих факторов эволюции, который обеспечивает приспосабливаемость организмов и лежит в основе естественного отбора, а также селекции [5]. Ряд аспектов химической составляющей изменчивости изучаются в рамках экологической биохимии.

Репозиторий ВГУ

Г Л А В А 13. **ТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК**

Технология рекомбинантных ДНК – это техники (методы), используемые для соединения молекул ДНК *in vitro* и интродуцирования (внедрения) их в клетки живого организма, где они реплицируются. Эти техники (методы) дают возможность: а) изоляции определенных участков ДНК (практически любого организма) и их амплификации с целью получения большего количества этих участков для последующего анализа; б) синтеза в организме/клетке-хозяине больших количеств определенных генных продуктов, полезных для медицины или промышленности; в) изучения взаимосвязей структура–функция гена при мутагенезе ДНК, клонированных *in vitro*. Под *клонированием* понимают получение клонов с помощью одного или многих методических приемов. Различают клонирование генов – выделение и амплификация отдельных генов в реципиентных клетках, а также молекулярное клонирование – размножение молекул ДНК в составе вектора. Клоном называют последовательности ДНК, полученные многократно при помощи методов генетической инженерии. *Клонирование ДНК* – это использование технологии рекомбинантной ДНК для инсерции (включения) фрагмента ДНК, например гена, в клонирующий вектор и размножение этой последовательности путем трансформации вектора в подходящую клетку-хозяина, например, в клетки кишечной палочки. *Клонирующим вектором* обычно является молекула нуклеиновой кислоты, которая способна автономно реплицироваться в хозяйской клетке и может включать в себя чужеродную ДНК. Вектор содержит свой собственный сайт начала репликации (ориджин), один или более сайтов для рестрикционных эндонуклеаз, которые применяются для инсерции (встройки) чужеродной ДНК, а также селективные маркеры. *Наиболее часто в качестве клонирующих векторов используются плазмиды или фаги*. Под ориджином репликации (*ori*) понимают нуклеотидную последовательность (*ori*-сайт), с которой начинается синтез ДНК. Кольцевые бактериальные генофоры (генетическая система у вирусов, прокариот и органелл, эквивалентная хромосомам у эукариот) содержат один *ori*-сайт, тогда как в каждой эукариотической хромосоме их много [3, 5].

Первая рекомбинантная ДНК была получена в 1972 г. П. Бергом и сотрудниками. Стратегия переноса функциональной единицы наследственности (гена) из одного организма в другой была разработана американскими учеными С. Коэном и Г. Бойером в 1973 г.

В 1976 г. ученые небольшой американской фирмы Genentech начали исследования по проблеме получения рекомбинантных ДНК.

Репозиторий ВГУ

Спустя 2 года были осуществлены следующие мероприятия [2]:

1) выделены фрагменты гена (последовательности ДНК) человеческого инсулина;

2) эти фрагменты перенесены в генетические элементы (клонирующие векторы), способные реплицироваться в клетках обычной кишечной палочки (*E. coli*);

3) клетки кишечной палочки синтезировали человеческий инсулин по программе введенных фрагментов гена инсулина;

4) полученный инсулин подвергался очистке и использовался как лекарственный препарат для больных диабетом, имеющих аллергическую реакцию на свиной инсулин.

К середине 90-х годов прошлого века на рынке появилось более десятка новых биотехнологических лекарственных препаратов, более 100 препаратов проходили клинические испытания и свыше 500 находятся в настоящее время на стадии разработки. Ежегодный оборот молекулярно-биотехнологической индустрии увеличился с 6 млн долларов в 1986 году к настоящему времени более чем в 10000 раз [2, 6, 8].

Итак, *генная инженерия* является *методической частью* молекулярной биотехнологии и служит для получения конечных биотехнологических продуктов (биополимеры, метаболиты, лекарственные препараты, вакцины, диагностические методы, высокопродуктивные и устойчивые сельскохозяйственные растения и животные). Молекулярная биотехнология базируется на теории и методах молекулярной биологии, микробиологии, биохимии, генетики, химической инженерии и клеточной биологии.

Роль генной инженерии в становлении молекулярной биотехнологии видна из анализа истории развития этой науки (табл. 13.1).

Таблица 13.1 – Историческая справка о становлении молекулярной биотехнологии и генной инженерии

Дата	Событие
1869	Ф. Мишер выделил ДНК из ядер нейтрофилов
1917	Карл Эреки ввел термин «биотехнология» на основе промышленного выращивания свиней с использованием сахарной свеклы
1943	Начало промышленного производства пенициллина
1944	Доказано, что носителем генетического материала является ДНК
1953	Предложена модель двойной спирали ДНК
1961	Открыто явление ренатурации ДНК и установлены точность и специфичность гибридизации полинуклеотидных цепей
1962	Опубликованы сведения о ферментах рестрикции ДНК

Репозиторий ВГУ

Окончание табл. 13.1

Дата	Событие
1966	Открыт генетический код
1970	Выделена первая рестриктаза (эндонуклеаза)
1972	Осуществлен синтез полноразмерного гена тРНК
1973	Создана технология рекомбинантных ДНК
1975	Описана технология получения моноклональных антител
1976	Опубликованы первые руководства для работы с рекомбинантными ДНК
1976	Созданы методы определения нуклеотидной последовательности ДНК
1978	Произведен человеческий инсулин, полученный с помощью *E. coli*
1981–1982	Получена трансгенная мышь. Получены трансгенные мушки дрозофилы
1983	Описано применение Ti-плазмиды для трансформации растений
1988	Генно-инженерным путем получена высокоопухолевая линия мышей
1988	Запатентован метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)
1990	Программа испытаний генной терапии с использованием соматических клеток человека
1990	Начало проекта «Геном человека»
1993	Получены трансгенные овцы с геном химозина
1996	Опубликован геном *Saccharomyces cerevisiae*
1997	Опубликован геном *Escherichia coli*
1997	Клонировано млекопитающее из дифференцированной соматической клетки
1998	Опубликован геном *Caenorhabditis elegans*
1999–2006	Секвенирование ДНК хромосом человека. Исследования продолжаются
2000	Опубликован геном *Drosophila melanogaster*
2001	Публикация «черновой версии» генома человека
2002	Публикация генома мыши
2003	Завершение проекта «Геном человека»
2004	Консенсус о количестве генов человека (20–25 тысяч)
2008	Описание структурных вариаций 8 человеческих геномов

Цели использования генной и генетической инженерии в рамках молекулярной биотехнологии:

1. Создание методов точной диагностики, а также технологий профилактики и лечения инфекционных и генетических (наследственных) заболеваний.

Репозиторий ВГУ

2. Создание микроорганизмов, продуцирующих различные химические соединения, антибиотики, полимеры, аминокислоты, ферменты.

3. Значительное повышение урожайности сельскохозяйственных культур путем создания растений, устойчивых к вредителям, грибковым и вирусным инфекциям и вредным воздействиям окружающей среды.

4. Создание пород сельскохозяйственных и других животных с улучшенными потребительскими признаками.

5. Переработка отходов, загрязняющих окружающую среду.

К наиболее важным *методам технологии рекомбинантных ДНК* относят [2, 6, 8, 14]:

1. Специфическое расщепление ДНК рестриктазами, что ускоряет выделение различных генов и манипуляции с ними.

2. Быстрое секвенирование очищенного фрагмента ДНК, позволяющее определить точные границы гена и кодируемую им аминокислотную последовательность полипептида.

3. Гибридизация нуклеиновых кислот, позволяющая с большой точностью выявить специфические нуклеотидные последовательности на основе их способности связывать комплементарные основания.

4. Клонирование ДНК, суть которого сводится к введению ДНК-фрагмента в самореплицирующийся генетический аппарат (плазмиду или вирус), который используют для трансформации бактерий.

5. Генная инженерия, позволяющая получать модифицированные версии генов и затем внедрять их в клетки или организмы.

13.1. Рекомбинация

Под рекомбинацией, или генетической рекомбинацией понимают комбинацию генов у потомков (молекул, клеток, организмов), отличающуюся от комбинации их у родителей. Это может быть связано с обменом последовательностей ДНК между двумя хромосомами или с новым взаимным расположением (ассоциацией) генов в рекомбинанте, возникающим вследствие перекомбинации несвязанных генов, кроссинговера между сцепленными генами или внутрицистронного кроссинговера. *Естественный процесс рекомбинации используется в экспериментах in vitro для клонирования ДНК*. В результате рекомбинации на молекулярном уровне образуются рекомбинантные (гибридные) ДНК [5].

Одним из важных вопросов трансформации клеток является дальнейшая судьба поглощенной ДНК. В компетентные клетки может проникать любая ДНК, но *рекомбинация происходит лишь тогда, если это ДНК близкородственного вида*. В этом случае возможен обмен гомологичными участками между собственной и проникшей извне ДНК.

Репозиторий ВГУ

Рассмотрим классическую процедуру технологии рекомбинантной ДНК (рис. 13.1) [12, 14].

1. Из организма – донора нужных генов – экстрагируют нативную ДНК (донорская ДНК, клонируемая ДНК, встраиваемая ДНК, ДНК-мишень, чужеродная ДНК). Эту ДНК подвергают ферментативному гидролизу и соединяют с другой ДНК (вектор для клонирования, клонирующий вектор) с образованием новой, рекомбинантной молекулы. Образуется новая рекомбинантная молекула: конструкция «клонирующий вектор–встроенная ДНК».

2. Эту конструкцию вводят в клетку-хозяина (реципиент), где она реплицируется и передается по наследству при каждом делении. Этот процесс называется трансформацией.

3. Отбирают клетки, несущие рекомбинантную ДНК (трансформированные клетки).

4. Получают специфический белковый продукт, синтезированный клетками-хозяевами, что служит подтверждением клонирования искомого гена.

Успех молекулярного клонирования зависит 1) от возможности воспроизводимо разрезать молекулу ДНК на фрагменты определенного размера и 2) способа их целенаправленного транспорта.

Донорская ДНК — *Клонируемый вектор-ДНК*

↓ ↓

Ген — *Векторная ДНК*

↓ ↓

↓

Рекомбинантная ДНК (ген+векторная ДНК)

↓

Встраивание рекомбинантной ДНК в клетку-хозяина

↓

Отбор трансформированных клеток

↓

Экспрессия гена

↓

Выделение и очистка белка

Рис. 13.1. **Схема технологии рекомбинантных ДНК.**

13.2. Рестриктазы

Для точного расщепления ДНК используют бактериальные рестрицирующие эндонуклеазы класса II. У рестриктаз этого класса сайты расщепления совпадают с сайтами узнавания или находятся рядом с ними на строго определенном расстоянии, что позволяет получать

Репозиторий ВГУ

рестрикты определенной длины. Кроме того, рестриктазы и метилазы этого класса действуют независимо, благодаря чему они широко применяются для генетического конструирования in vitro. Например, метилазы класса II используют обычно для модификации (метилирования) in vitro сайтов узнавания с целью защиты последних от действия одноименных рестриктаз.

Рестриктазы узнают определенные последовательности нуклеотидов и разрезают двухцепочечную ДНК на фрагменты. Модификация заключается в метилировании определенных оснований в последовательности, узнаваемой сопряженной рестриктазой; тем самым обеспечивается защита данного участка ДНК от воздействия рестриктазы. Одновременное наличие в клетке этих двух ферментативных активностей (так называемая *R-M система*) препятствует гидролизу собственной нуклеиновой кислоты. Чужеродная же ДНК при проникновении в бактериальную клетку служит субстратом для обоих ферментов [14].

Сайт узнавания – это специфическая последовательность ДНК, с которой связываются рестрикционные эндонуклеазы, а также начинается расщепление молекулы ДНК данным ферментом. Обычно сайт узнавания представлен коротким палиндромами (перевертыш типа «кок», «шалаш»). Под сайтом рестрикции понимают последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК, в месте расположения которой определенная рестрикционная нуклеаза разрезает (расщепляет) ее [5].

Одна из первых рестрицирующих эндонуклеаз II класса была выделена из бактерии *E. coli* и получила название *Eco*RI. Этот фермент узнает участок ДНК, содержащий специфическую палиндромную последовательность G-A-A-T-T-C, и катализирует разрыв между остатками гуанина (G) и аденина (A) в каждой цепи. Происходит расщепление связи между атомом кислорода при 3'-атоме углерода дезоксирибозного остатка одного нуклеотида и фосфатной группой, присоединенной к 5'-углеродному атому дезоксирибозы соседнего нуклеотида. Разрывы в цепи ДНК располагаются наискось друг от друга, в результате чего образуются одноцепочечные комплементарные концы с «хвостами» из четырех нуклеотидов в каждом (липкие концы). Каждый одноцепочечный «хвост» заканчивается 5'-фосфатной группой, а 3'-гидроксильная группа противоположной цепи как бы утоплена (рис 13.2).

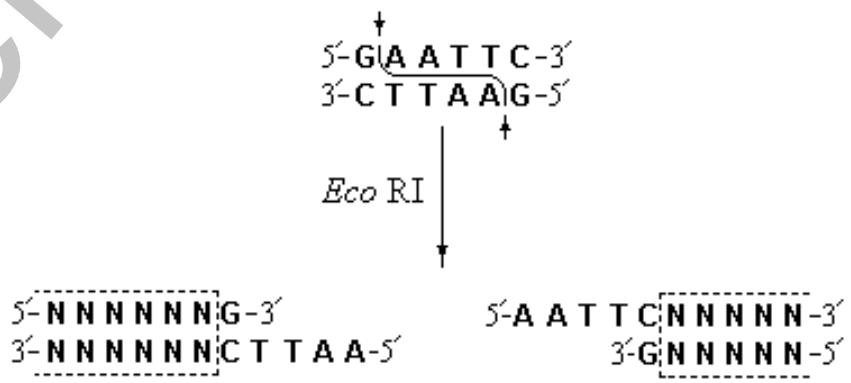


Рис. 13.2. Формирование липких концов.

Репозиторий ВГУ

К настоящему времени получено несколько тысяч рестриктаз; их номенклатура: род микроорганизма обозначается прописной буквой, а вид – двумя строчными, штамм обычно не указывается; римские цифры – порядковый номер данной эндонуклеазы в ряду прочих рестриктаз, выделенных из данного микроорганизма (см. выше *Eco*RI). По способу расщепления ДНК рестриктазы класса II разделяются на два типа: 1) катализируют косое расщепление двойной спирали ДНК с образованием «липких концов» и 2) катализируют перпендикулярный разрыв с образованием «тупых концов».

Рестриктазы используют для 1) изучения последовательности нуклеотидов в ДНК и 2) в генной инженерии. В последнем случае рекомбинантные ДНК получают, когда два разных образца ДНК обрабатывают, как правило, *одной и той же рестриктазой* с образованием фрагментов с липкими концами, а затем смешивают эти образцы. Благодаря комплементарному спариванию липких концов фрагментов разных образцов ДНК могут образовываться новые комбинации генов. Этот ключевой механизм молекулярного клонирования поддерживается тремя способами:

1. Фрагменты ДНК, образующие комплементарные дуплексы в области липких концов удерживаются водородными связями недостаточно прочно, чтобы молекулы в растворе оставались стабильными длительное время. Для их соединения служит ДНК-лигаза. Этот фермент катализирует образование фосфодиэфирных связей между соседними нуклеотидами в молекуле ДНК. В технологии рекомбинантной ДНК используются в основном две ДНК-лигазы: *E. coli* и фага *T*4. Обе лигазы служат для репарации (восстановления) одноцепочечных разрывов в дуплексной молекуле ДНК и для соединения двух молекул ДНК путем лигирования тупых или липких концов. ДНК-лигированием называют формирование фосфодиэфирных связей между близлежащими (соседними) нуклеотидами в одной и той же или двух различных молекулах ДНК через 5′-фосфатные и 3′-гидроксильные группы дезоксирибозы [5, 8].

2. Объединение разных молекул ДНК (образование рекомбинантных ДНК) требует их реплицирования в клетке-хозяине. Следовательно, одна часть рекомбинантной молекулы ДНК должна нести нужный ген, который предполагается клонировать, а другая – должна содержать информацию, необходимую для переноса в клетку-реципиент рекомбинантной ДНК (клонирующие векторы).

3. При рестрикции ДНК образуется смесь разнообразных фрагментов, а затем после их лигирования с векторной ДНК образуется множество различных комбинаций. Поэтому существуют специальные системы скрининга для распознавания реципиентных клеток, содержащих ДНК с нужной для клонирования нуклеотидной последовательностью [2, 6, 8].

Репозиторий ВГУ

13.3. Полимеразы

ДНК- и РНК-полимеразы обеспечивают матричный синтез ДНК и РНК, соответственно в направлении 5′→3′. Отличие состоит в том, что ДНК-полимеразам для этой цели необходим *праймер* со свободной 3′ОН-группой дезоксирибозы, а РНК-полимеразы способны сами ставить на матрице первый нуклеотид. Большинство ДНК-полимераз обладают также 3′→5′ экзонуклеазной (редакторской) активностью, предназначенной для удаления ошибочно присоединенных нуклеотидов.

ДНК-полимеразы – ферменты, участвующие в синтезе ДНК. У *E. coli* были выделены 3 типа ДНК-полимераз: *pol* I, *pol* II и *pol* III. *Pol* III является основным ферментом, ответственным за репликацию ДНК в клетке бактерий. Два других фермента функционируют преимущественно при восстановлении (репарации) ДНК. Эукариоты содержат множество видов ДНК-полимераз, находящихся в разных частях клетки: в ядре, цитоплазме или митохондриях, и выполняют различные функции, такие, как репликация, репарация и рекомбинация. ДНК-полимеразой I (*Pol* I, полимераза Корнберга) является фермент *E. coli* размером в 109 кД. ДНК-полимераза I необходима для репарации и репликации ДНК *in vivo*. ДНК-полимераза I дополнительно обладает 3′→5′-полимеразной активностью при наличии затравки (праймера) и матрицы. Фермент обладает 3′→5′-экзонуклеазной активностью (экзонуклеаза II), что позволяет удалять нуклеотиды с праймерной нити, и 5′→3′-экзонуклеазной активностью (экзонуклеаза VI), позволяющей удалять нуклеотиды перед растущей праймерной нитью. Широко известен фрагмент в 76 кД этой полимеразы (фрагмент Кленова), обладающий полимеразной и 3′→5′-экзонуклеазной функциями. Как полный фермент, так и фрагмент Кленова используются для мечения ДНК in vitro методом ник-трансляции и для заполнения 3′-концов в дуплексной молекуле ДНК. Ник (одноцепочечный разрыв) – это разрыв одной 5′,3′-фосфодиэфирной связи в одной или двух нитях двунитчатой молекулы ДНК. Ник-трансляцией (смещением разрыва) называют замену нуклеотидов в двунитчатой ДНК радиоактивно меченными нуклеотидами с использованием ник-активности ДНКазы I и полимеразной активности ДНК-полимеразы I (из *E. coli*). Для этого ники создаются в немеченой (холодной) молекуле ДНК путем частичного вырезания нуклеотидов при помощи ДНКазы I с образованием 3′-ОН-концов. Добавляется ДНК-полимераза I, которая начинает реакцию репликации с 3′-ОН-конца каждого разрыва и одновременно удаляет нуклеотиды с 5′-стороны (благодаря способности ДНК-полимеразы I проявлять еще 5′-3′-экзонуклеазную активность). Т.е. образуются новые ники. Если в реакционную среду добавить один какой-либо меченый нуклеотид (например, α^{32}P-дезоксинуклеотидтрифосфат), то в процессе полимеразной реакции произойдет замещение исходных нуклеотидов в двунитчатой ДНК на радиоактивно меченные. Метод ник-трансляции широко используется для создания меченых зондов [5].

В методиках генетической инженерии используют фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I (in vitro при оптимальных условиях скорость работы этого фермента составляет около 30 нуклеотидов в секунду), ДНК-полимераза фага *T*4 и фага *T*7 (используется для копирования длинных матриц). Важную роль играют термостабильные Taq-полимераза (используется в полимеразной цепной реакции для накопления ДНК) и ДНК-полимеразы Vent и Deep Vent (сохраняют до

Репозиторий ВГУ

половины активности после 7 и 23-часового прогрева при 95ºС, соответственно).

Среди РНК-полимераз особое место занимает РНК-зависимая ДНК-полимераза. Биологическое значение этой полимеразы заключается в образовании ДНК-копий геномов некоторых РНК-содержащих вирусов, поэтому ее называют еще обратной транскриптазой [8].

Обратная транскриптаза, РНК-зависимая ДНК-полимераза, ревертаза – ретровирусный многофункциональный фермент класса трансфераз, синтезирующий двунитчатую ДНК с использованием в качестве матрицы однонитчатой РНК. У некоторых ретровирусов обратная транскриптаза является мономером, у других – димером. Считают, что обратная транскриптаза, по-видимому, участвует также в мобилизации ретротранспозонов (например, *Ty*-элементы у дрожжей) и образовании псевдогенов. Они используются: а) в ДНК-рекомбинантной технологии для синтеза кДНК (комплементарная ДНК) с информационной РНК; б) в генной инженерии для получения нужных ДНК *in vitro*. У прокариотических организмов обратная транскриптаза не обнаружена. Комплементарная ДНК (кДНК, скопированная ДНК, копийная ДНК) – одно- или двунитчатая молекула ДНК, синтезируемая *in vitro* с помощью обратной транскриптазы или ДНК-полимеразы, копия иРНК, соответствующая определенному гену без интронов [5].

Обычно используют фермент, кодируемый вирусом миелобластоза птиц. Скорость работы этого фермента *in vitro* при оптимальных условиях низка, всего 5 нуклеотидов в секунду. С помощью обратной транскриптазы можно синтезировать копию любой части иРНК. Эта возможность облегчает анализ строения какого-либо специфического участка гена.

13.4. Векторы для клонирования в бактериях

Вектором в генетической инженерии называют молекулу ДНК, способную самостоятельно реплицироваться, включать чужДНК, переносить ее в реципиентные клетки и стабильно там поддерживать. Векторы используют для создания *in vitro* молекул рекомбинантных ДНК и для последующего введения их в клетки, в результате чего индивидуальные молекулы из исходной смеси рекомбинантных ДНК разделяются по отдельным клонам и в составе последних умножают (клонируют) число чужеродных генов. В этом смысле любой вектор является клонирующим. Векторы также значительно облегчают процедуры по выделению клонированной ДНК из клеток. Подлежащий переносу генетический материал вводится в состав вектора с помощью различных ферментов (рестриктаз, ДНК-лигазы).

По области использования различают: 1) векторы общего назначения (клонирование геномных генов, кДНК, любых фрагментов ДНК); 2) векторы для экспрессии клонированных генов (синтез иРНК и белков) и 3) специализированные векторы (секвенирование и мутирование генов, изучение особенностей регуляции клонированных генов, идентификация в клонируемой ДНК промоторов и других регуляторных сайтов).

Репозиторий ВГУ

По происхождению ДНК векторы делят на: 1) плазмидные (существуют в клетке и вне ее только в виде молекул ДНК); 2) фаговые (существуют в виде молекул ДНК и вирионов) и 3) гибридные (сочетают отдельные свойства плазмид и фагов).

По структуре ДНК различают кольцевые и линейные векторы.

По способу поддержания в клетке выделяют: 1) автономные (реплицируются самостоятельно) и 2) интегративные (реплицируются в составе клеточной хромосомы) векторы.

По числу молекул в клетке векторы могут быть: 1) малокопийными (несколько копий) и 2) мультикопийными (десятки копий) [8].

Для эффективного выполнения своей функции вектор должен отвечать определенным требованиям:

1. Быть *репликоном*, чтобы стабильно существовать в клетке. Репликоном называют фрагмент ДНК, находящийся под контролем рядом расположенного и инициирующего репликацию локуса (репликатора), ведущего себя как автономная единица в течение репликации ДНК. Число репликонов на один организм варьируется: например, у прокариот репликон представлен всем геномом, а у эукариот геном включает множество репликонов, и их число в ряде случаев коррелирует с уровнем организации организмов (например, у дрожжей – 500, у дрозофилы – 3500, у ксенопус – 15000, у *Vicia faba* – 35000). В генетической инженерии для получения вектора нужные фрагменты ДНК (гены) пришиваются к подходящему репликону. Репликатор (ген-репликатор) – генетический фактор, который контролирует репликацию репликона и функционально связан с геном-инициатором. При отсутствии репликации он находится в репрессированном (подавленном) состоянии [5].

2. Иметь селективный маркер, позволяющий отбирать трансформированные вектором клетки.

3. Иметь, по крайней мере, один единичный сайт рестрикции для внедрения в него чужДНК (их иногда называют сайтами клонироваия).

Большинство векторов носит специализированный характер, т.е. их приспосабливают для решения узкого круга задач. Например, векторы, предназначенные для экспрессии генов, содержат около сайтов клонирования мощные промоторы, причем экспрессия может быть регулируемой или нерегулируемой (конституитивной). Присутствие в таких векторах специальных сигнальных последовательностей нуклеотидов обеспечивает секрецию продуктов клонируемых генов.

Выбор вектора – плазмидного или фагового – определяется целью клонирования и условиями генноинженерного эксперимента. Размер плазмидных векторов обычно невелик – несколько тысяч пар нуклеотидов. Для увеличения числа уникальных сайтов, используемых для клонирования генов, в плазмиды вводят *полилинкеры*, т.е. синтетические полинуклеотиды, содержащие до десятка и более различных сайтов клонирования (их обозначают MCS – multiple cloning sites). Фаговые векторы конструируют на базе ДНК фагов с таким расчетом, чтобы в них сохранилась информация, которая обеспечивает сборку *in vivo* фаговых частиц, и чтобы имелась возможность упаковать рекомбинантные ДНК в фаговые головки. Фаговые векторы

Репозиторий ВГУ

можно упаковать *in vitro* в *капсиды*, что значительно увеличивает эффективность их введения в реципиентные клетки. Капсид – белковая оболочка вириона или вирусной частицы. Форма капсида генетически детерминирована и является таксономическим признаком [5, 8].

Фаговые векторы и фаговые рекомбинантные ДНК относительно легко выделяются из клеток без примеси бактериальной ДНК, поскольку при этом они находятся в составе фаговых частиц.

13.4.1. Плазмидные векторы

Природные (не модифицированные) плазмиды обычно лишены одного или нескольких свойств, необходимых для эффективного переноса *in vitro*, поэтому качественные плазмидные векторы приходится также создавать методами генной инженерии.

В технологии рекомбинантных ДНК классическим является плазмидный вектор pBR322. Номенклатура: p – от английского plasmid, следующие буквы имеют отношение к описанию вектора или истории его создания (для данного вектора буквы BR указывают на авторство Ф. Боливара и Р. Родригеса); цифра 322 – номер из исследовательского протокола. Размер плазмиды pBR322 – 4361 п.н. Плазмидный вектор несет два гена устойчивости к антибиотикам – ампициллину и тетрациклину, а также уникальные сайты узнавания ферментами рестрикции для *Bam*HI, *Hind*III, *Sal*I в гене Tc^R, один *Pst*I-сайт в гене Ap^R, один сайт для *Eco*RI, находящийся за пределами кодирующих последовательностей, и сигнал начала репликации, обеспечивающий репликацию исключительно в бактериальных клетках кишечной палочки. Все последующие манипуляции были направлены *на увеличение числа уникальных сайтов рестрикции и уменьшение размера плазмиды*. Широкое использование pBR322 в качестве клонирующего вектора связано с тем, что полностью известна ее нуклеотидная последовательность. Плазмида pBR322 и ее производные использовались в качестве модельных систем для изучения различных свойств молекул ДНК как *in vivo*, так и *in vitro*.

Принцип работы плазмидного вектора pBR322:

1. Плазмиду pBR322 обрабатывают рестриктазой, которая катализирует ее разрыв в *единственном сайте, расположенном в одном из генов устойчивости* к тому или иному антибиотику. Образуется линейная молекула с липкими концами.

2. Донорную ДНК, содержащую нужный ген, обрабатывают *той же рестриктазой*, что приводит к образованию фрагментов ДНК с липкими концами.

3. Линейные молекулы плазмиды pBR322 смешивают с обработанной донорной ДНК. Поскольку липкие концы этих двух ДНК взаимно комплементарны, они спариваются с образованием гибридных молекул.

4. Для стабилизации гибридных молекул ДНК производят обработку *ДНК-лигазой* фага Т4 в присутствии АТФ, в результате чего обра-

Репозиторий ВГУ

зуется множество разных комбинаций фрагментов. Кроме того, образуются нежелательные продукты, объединяющие между собой фрагменты донорной ДНК и исходные плазмидные ДНК. Для их уменьшения обрабатывают рестрицированную плазмидную ДНК щелочной фосфатазой, отщепляющей от линейной молекулы 5'-фосфатные группы. В результате ДНК-лигаза не сможет сшить концы дефосфорилированной линейной плазмидной ДНК. Что касается собственно рекомбинантных молекул ДНК, то два из четырех одноцепочечных разрывов при действии ДНК-лигазы устраняются, и конструкция оказывается стабильной благодаря образовавшимся фосфодиэфирным связям.

5. После введения гибридной ДНК в клетку хозяина происходит ее репликация и образуются новые кольцевые молекулы уже без разрывов [6].

Заметим, что во многих учебных пособиях говорится о том, что для встраивания чужеродного фрагмента ДНК в вектор и плазмиду и донорную ДНК обрабатывают *одной и той же рестриктазой*. При смешивании линеаризованной плазмиды с донорной ДНК может образоваться множество вариантов, главными из которых являются следующие – образуется исходная кольцевая плазмида, не несущая вставки, донорский фрагмент может сам по себе приобретать кольцевую форму, а также может образоваться как минимум два варианта рекомбинантной ДНК. Один вариант несет «правильно ориентированную» вставку, а другой инвертированную вставку того же фрагмента, при этом матричная и комплементарная цепи вставки меняются местами. Последующая транскрипция приведет в первом случае к образованию правильной транслируемой иРНК, а во втором случае к синтезу неправильного РНК-транскрипта (рис. 13.3).

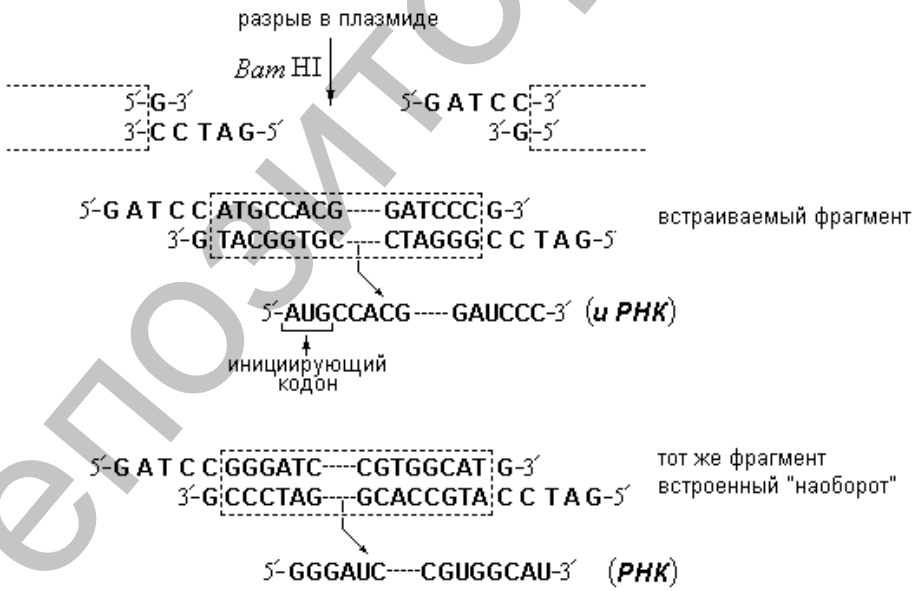


Рис. 13.3. **Варианты рекомбинантной ДНК при обработке донорной ДНК и плазмиды одной и той же рестриктазой.**

Избежать подобных «неприятностей» можно путем обработки плазмидной ДНК и донорской ДНК двумя различными рестриктазами. В случае плазмиды pBR322 такими парами рестриктаз могут быть *Hind*III и *Bam*HI, *Hind*III и *Sal*I или *Bam*HI и *Sal*I.

Следующий этап – это *идентификация клеток, содержащих рекомбинантную ДНК*. При использовании плазмиды pBR322, в которой

Репозиторий ВГУ

чужеродная ДНК встраивается в сайт *Bam*HI, специфическая идентификация состоит из двух этапов:

1. Клетки после трансформации высевают на питательную среду, содержащую ампициллин. Вырастают только клетки с наличием интактного гена Ap^R (или в составе интактной плазмиды pBR322, или в составе гибридной плазмиды). *Нетрансформированные клетки чувствительны к ампициллину.* Сайт *Bat*HI расположен в гене Tc^R плазмиды pBR322; встраивание в этот ген фрагмента ДНК прерывает кодирующую последовательность, в результате чего устойчивость к тетрациклину утрачивается. Следовательно, *клетки, которые несут гибридную плазмиду, устойчивы к ампициллину и чувствительны к тетрациклину, а клетки, получившие интактную плазмиду pBR322, несут ген Tc^R и устойчивы как к ампициллину, так и к тетрациклину.*

2. Клетки, выросшие на среде с ампициллином, переносят на среду с тетрациклином. Клетки, образующие колонии на чашках с тетрациклином, содержат интактную плазмиду pBR322 (они устойчивы к обоим антибиотикам). Клетки, не выросшие на среде с тетрациклином, чувствительны к этому антибиотику, а значит они содержат гибридную плазмиду pBR322. Среди колоний, выросших на среде с ампициллином, выделяют те, которые оказались чувствительны к тетрациклину, и из каждой колонии получают индивидуальные клеточные клоны. Чаще объединяют все колонии, устойчивые к ампициллину и чувствительные к тетрациклину, культивируют их вместе. Далее проводят дополнительный скрининг и идентифицируют те клетки, которые несут гибридную плазмиду pBR322 со специфической вставкой [6, 8].

Интерес представляют векторы прямой селекции. Они содержат ген (или сайт), продукт которого (или сама последовательность) в определенных условиях является «ядом» для клеток. Мишенью может быть ген-репрессор, контролирующий ген антибиотикоустойчивости или цитотоксические гены (например, *kil, ccd*), находящиеся под строгим контролем. Инактивация подобных генов внедрением в них чужДНК позволяет трансформантам выжить в этих условиях.

13.4.2. Фаговые векторы

Для клонирования в клетках *E. coli* разработаны векторы на базе ДНК фагов λ и M13. Фаг λ может переносить чужие гены *in vivo* и *in vitro* потому, что в середине его генома имеется область, несущественная для развития фага. Она замещается на бактериальные гены при образовании трансдуцирующих фагов и она же используется для внедрения чужДНК в вектор методами *in vitro*. Емкость фагового вектора, т.е. теоретически наибольший размер чужДНК, вставляемой в него, вычисляется как разность между максимальной величиной молекулы ДНК, упаковываемой в головку фага λ (она равна 52 т.п.н.), и минимальной величиной генома фага, необходимой для его развития. Последняя подсчитывается как разность между длиной ДНК (48,5 т.п.н.)

Репозиторий ВГУ

и суммарной длиной областей, несущественных для развития фага. Отбор фагов, содержащих только рекомбинантные ДНК, ведут методами прямой и непрямой селекции, описание которых выходит за пределы данного пособия. Фаговые векторы и созданные на их основе рекомбинантные ДНК можно вводить в клетки *E. coli* методом трансформации, называемой в таком частном случае *трансфекцией*. Эффективность метода относительно низкая.

Близкородственные нитевидные колифаги M13, fl и fd обладают одноцепочечной кольцевой ДНК, состоящей из 6,4 тысяч нуклеотидов. В их ДНК между генами *II и IV* имеется межгенный участок (спейсер), в который можно вставлять чужеродные гены. Размер капсиды зависит от длины упаковываемой молекулы ДНК, что позволяет клонировать фрагменты ДНК размером до 15 тысяч нуклеотидов.

К гибридным векторам условно относят векторы, которые сочетают в себе все или отдельные свойства плазмидных и фаговых векторов. *Фагмиды* – плазмидные векторы, содержащие *ori*-сайт нитевидных фагов (pEMBL, hUC118/119 и др.) [8]. *Космидами* называются векторные плазмиды, содержащие *cos*-участок (*cos*-сайт) ДНК фага λ, являющийся местом замыкания его линейной формы в кольцо. Благодаря наличию *cos*-участка космида, включающая чужеродные гены, может быть упакована в головку фага *in vitro* [5]. Размер космид в среднем составляет 5 т.п.н., что позволяет с их помощью клонировать ДНК размером до 45–47 т.п.н. Поэтому космиды предназначены для конструирования банков генов. *Фазмидные векторы* удачно сочетают в себе положительные свойства фаговых и плазмидных векторов. Емкость одного из таких векторов λpMYF131 составляет 4,4–19,6 т.п.н., что позволяет привлекать его для получения банков генов.

Если необходимо, чтобы чужДНК находилась в составе клеточной хромосомы, а также для предотвращения опасности ее «утечки» в другие виды бактерий, используют *векторы-транспозоны*. В этом случае в качестве транспортеров генов применяют модифицированные транспозоны, которые переносятся в клетки подходящими плазмидами или фагами. У векторов-транспозонов удаляют гены транспозаз, лишая их тем самым способности к самостоятельным перемещениям. На их место вставляется чужДНК. Сами гены транспозаз внедряют в векторы-носители транспозонов и именно с их помощью транспозоны переносятся в клеточный геном. Векторам, которые переносят транспозоны, придают способность к «самоубийству», т.е. после цикла клеточного деления эти векторы элиминируются [8].

Напомним, что вектор-самоубийца, суицидальный вектор: 1. Вектор клонирования, содержащий ген, который кодирует функцию летальности для его хозяина. Трансформанты, получившие такой вектор, как правило, погибают. Однако если в вектор-самоубийцу встроить чужеродную ДНК, которая разрушит летальную функцию, то трансформант выживает. 2. Вектор клонирования, используемый для клонирования последовательностей ДНК и их переноса в реципиентные

Репозиторий ВГУ

клетки, в которых он претерпевает гомологичную рекомбинацию с репликоном клетки, в результате чего теряет свои жизненные функции. Поврежденный вектор элиминируется (удаляется) из клетки [5].

После такого «самоубийства» векторов-носителей рекомбинантный транспозон остается локализованным в определенном месте клеточного генома [8].

13.5. Векторы для клонирования в эукариотических клетках

Клонирование больших (50–100 т.п.н. и более) фрагментов ДНК является важной проблемой генной инженерии эукариот. Дрожжи *S. cerevisiae* являются первым эукариотическим организмом, геном которого, состоящий из 16 хромосом, полностью секвенирован. Последовательность из 12 млн п.н. содержит около 6000 генов. В этих клетках лишь в три раза больше ДНК, чем у бактерий. Это позволяет относительно легко проводить скрининг клонов, содержащих рекомбинантные молекулы ДНК. Для клонирования фрагментов ДНК в дрожжевых клетках используют, как правило, *челночные векторы*. Челночный вектор (бифункциональный вектор, шаттл-вектор) – плазмидный клонирующий вектор, содержащий последовательности ДНК, которые позволяют его селекцию и автономную репликацию в двух различных организмах (напр., *S. cerevisiae* и *E. coli* или *A. tumefaciens* и *E. coli*) [5]. Наиболее известны векторы типов *YIh (yeast integrating plasmid), Yep (yeast episomal plasmid), YRp (yeast replicating plasmid), YCp (yeast centromere plasmid), YLp (yeast linear plasmid)* и др. Первым индивидуальным животным белком, синтезированным в дрожжах, был человеческий лейкоцитарный интерферон.

Определенный исторический интерес представляют экспрессирующие векторы на основе *бакуловирусов*, в частности, бакуловируса AcMNPV, инфицирующего клетки многих насекомых. При своем развитии они образуют в клеточном ядре белковые тела включения, состоящие в основном из полиэдрина, ген которого обладает мощным промотором. Именно этот промотор используется для экспрессии в клетках насекомых клонированных генов. Исходная стратегия предполагала трансфекцию клеток насекомого, зараженных бакуловирусом, транспортным вектором, который содержал клонированный ген. В результате клетки насекомого, инфицированные рекомбинантным бакуловирусом, синтезировали рекомбинантный белок. Примерно 95% рекомбинантных белков, синтезированных в системах экспрессии клонированных генов на основе бакуловирусов, имели соответствующие посттрансляционные модификации [8].

В естественных условиях двудольные растения подвергаются трансформации Ti- и Ri-плазмидами агробактерий.

Репозиторий ВГУ

T-ДНК, переносимая ДНК (от *transferred DNA*) – часть Ti-плазмиды в вирулентной *Agrobacterium tumefaciens* или Ri-плазмиды в вирулентной *Agrobacterium rhizogenes*, которая переносится из бактерии в ядерный геном растительных клеток. Там она стабильно интегрирует в геном и экспрессируется, вызывая постоянную пролиферацию (размножение) хозяйских клеток в опухоль (корончато-галловые опухоли или болезнь «бородатый»/«волосатый» корень). *T*-ДНК фланкирована прямыми повторами, так называемыми *T*-ДНК границами, пограничными последовательностями. Пролиферация индуцируется за счет экспрессии 1, 2 и 4-го генов *T*-ДНК. Гены 1 и 2 кодируют ферменты, превращающие триптофан в индолацетамид (триптофанмоноксигеназа), а индолацетамид – в индолилуксусную кислоту (ИУК, фермент индолацетамидгидролаза). Ген 4 кодирует изопентенилтрансферазу, катализирующую синтез растительного гормона цитокинина зеатинового типа. В зависимости от штамма *Agrobacterium tumefaciens T*-ДНК может отличаться по характеру опухолеобразования и по генам, кодирующим ферменты, которые катализируют синтез различных опинов. Например, в так называемых нопалиновых опухолях *T*-ДНК присутствует в виде протяженной последовательности в 23 т.п.н., содержащей 13 генов, среди которых есть ген нопалинсинтазы. Он кодирует необычную аминокислоту – нопалин. В опухолях октопинового типа, продуцирующих необычную аминокислоту – октопин, *T*-ДНК представлена двумя участками – 12 т.п.н. T_L-ДНК (левая) и 7 т.п.н. T_R-ДНК (правая), разделенными последовательностями растительной ДНК. T_L-ДНК ответственна за опухолеобразование и образует 8 транскриптов, T_R-ДНК кодирует 5 транскриптов [5].

Итак, трансформированные Ti-плазмидами клетки становятся опухолевыми и образуют корончатые галлы. Инфекционное начало содержится в Т-ДНК Ti-плазмид. *Т-ДНК фактически являются природными экспрессионными векторами*. Они стабильно поддерживаются в реципиентных клетках, переносят в них чужеродную ДНК, которая транскрибируется с образованием функционально активных белков, а селективным маркером служит признак онкогенности трансформированных клеток. Затем были созданы векторы для трансформации протопластов. Такие векторы содержат все необходимые элементы для манипулирования ими в клетках *E. coli*, маркер для селекции растительных трансформантов и полилинкер. Важно, что эти векторы можно использовать для трансформации протопластов как однодольных, так и двудольных растений.

Апробирован метод прямой микроинъекции рекомбинантной ДНК в ядра протопластов. Частоты трансформации при этом столь велики (5–25%), что отпадает необходимость в использовании селективных маркеров. Поскольку растительные клетки имеют прочную стенку, пока единственным универсальным способом ее преодоления является обстрел растительных тканей ускоренными микрочастицами вольфрама, выдержанными в растворе векторной ДНК или РНК.

У высших эукариот ядерные плазмиды пока не описаны, поэтому естественными кандидатами на роль доноров своих репликаторов для конструируемых векторов животных являются вирусы. В исследованиях по молекулярной генетике животных вирус *SV40* играет такую же роль, как фаг λ в бактериальной генетике. Неслучайно, что ДНК обоих вирусов

Репозиторий ВГУ

широко используется в качестве векторов в генетической инженерии. Вирус *SV40*, содержащий двуцепочечную кольцевую ДНК из 5243 п.н., развивается в клетках обезьяны, образуя 10^4–10^5 частиц на клетку. Клетки при этом гибнут. При инфицировании перевиваемых клеток некоторых грызунов (мыши, крысы, хомячки) развитие этого вируса блокируется на стадии репликации его ДНК. В результате вирусная ДНК интегрируется в хозяйскую ДНК, вызывая геномные перестройки и клеточную онкотрансформацию (бесконтрольное деление клеток) [8].

При конструировании векторов для эукариот часто используют принцип *экспрессионной кассеты*.

Экспрессионной кассетой называют синтетический фрагмент ДНК, в который может быть клонирована чужеродная ДНК. Как правило, это часть экспрессирующегося вектора. Экспрессионным вектором (экспрессионный клонирующий вектор, транскрипционный вектор) называют плазмидную или фаговую клонирующую конструкцию, специально созданную для эффективной транскрипции клонированной ДНК и трансляции соответствующей иРНК. Экспрессионный вектор часто содержат экспрессионную кассету, включающую высокоактивную (сильную) промоторную последовательность (напр., *lacUV*5, *trp*, *CfMV*35*S*, хитшоковые промоторы и др.), подходящий сайт для клонирования и сигнал терминации (окончания) транскрипции. Любой ген, клонированный в экспрессионный вектор в правильной позиции, экспрессируется с высокой эффективностью. Экспрессионные векторы могут также содержать сайты для присоединения рибосом, что увеличивает надежность синтеза белка с иРНК, а также последовательности сигнальных пептидов, обеспечивающих секрецию вновь синтезированного белка. Экспрессионный вектор для растений – плазмидный клонирующий вектор, специально сконструированный для эффективной транскрипции клонированных фрагментов ДНК и трансляции соответствующих транскриптов в растительных клетках. Такие векторы содержат конститутивный высокоактивный (сильный) промотор (напр., *CaMV35*-промотор), или индуцибельный (гормонами, светом), или регулируемый промотор. Сразу за промотором инсерцируется (вставляется) соответствующий сайт клонирования и последовательность, терминирующая транскрипцию у растений. Любой чужеродный ген без промотора, клонированный в экспрессионном векторе растений, активно экспрессирует в трансгенных растениях [5].

Базовыми элементами эукариотической экспрессионной кассеты являются промотор и сайт полиаденилирования, в котором формируется 3′-конец транскрипта. Дополнительными элементами служат энхансеры и интроны. В отличие от сигналов процессинга иРНК, которые функционируют эффективно во всех типах клеток животных, детальное строение промоторов и энхансеров значительно варьирует у разных генов. Многие энхансеры тканеспецифичны. Наиболее универсальны вирусные энхансеры, из которых широко используются энхансеры вирусов *SV40* и саркомы Рауса. Сигналы сплайсинга хотя и универсальны, но не безразличны к прилегающим к ним экзонным последовательностям нуклеотидов ДНК. В случае конструирования рекомбинантной ДНК, в транскрипте которой будут соединены не взаимодействующие в норме сигналы сплайсинга, процесс вырезания

Репозиторий ВГУ

экзонов может оказаться неточным.

Разработаны системы экспрессии млекопитающих, позволяющие получать белки, состоящие из двух разных субъединиц. Для этого хозяйские клетки трансфицировали сразу двумя векторами, каждый из которых несет ген одной из субъединиц. Возможно использование одного вектора, который несет эти два гена в виде отдельных единиц транскрипции или в виде одного транскриптона, содержащего оба этих гена [2, 12, 8, 14].

13.6. Геномная библиотека

Геномная библиотека представляет собой совокупность всех нуклеотидных последовательностей хромосомной ДНК организма в виде фрагментов ДНК, клонированных в векторах. Если фрагменты физически картированы, т.е. если установлено их расположение на хромосомах, то такую библиотеку называют геномной энциклопедией [8].

Геномная библиотека, банк генов – набор клонированных фрагментов ДНК, представляющих индивидуальный (групповой, видовой) геном. У млекопитающих (в том числе у человека) геномы крупные, поэтому для них создают хромосомоспецифичные библиотеки. *Хромосомной библиотекой* называют один из видов геномной библиотеки, используемый для анализа геномов больших размеров, например, человека. Хромосомную библиотеку создают клонированием фрагментов ДНК индивидуальных гомологичных хромосом, полученных путем сортинга (хромосом сортировка) хромосомных суспензий. Под сортингом (хромосом сортировкой) понимают разделение хромосом по размерам после окраски их флуохромами, основанное на методе проточной цитометрии с применением лазера. *Генов библиотека* (генов банк) – коллекция произвольно клонированных фрагментов геномной ДНК организма или специальный набор фрагментов ДНК, представляющих, например, коллекцию иРНК, экспрессирующуюся в клетке в определенное время. В таких библиотеках фрагменты инсерцируются (включаются) в векторы, например, космидные или бактериальные векторы, и трансформируются в подходящего хозяина. В идеале геномная библиотека должна содержать практически весь геном вида, из которого она происходит, а библиотека кДНК – все различные молекулы иРНК данной клетки на одной и той же стадии развития. Если в банке генов представлены все гены организма (то есть вероятность отсутствия какого-либо участка генома не превышает 0,01%), она называется представительной библиотекой генов. Сейчас сконструировано множество типов генных библиотек для различных целей исследования [5].

Следующий после создания геномной библиотеки этап – это *поиск клона (клонов), несущего искомую последовательность ДНК*. Для этого используют три основных метода:

1. Гибридизация с меченым ДНК-зондом с последующим радиоавтографическим анализом. После трансформации высевают клетки на чашки с питательной средой и переносят выросшие колонии на твердую подложку (нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр). Лизируют клетки. Производят депротеинизацию и денатурацию ДНК. Фиксируют ДНК на подложке. Наносят на фильтр меченый зонд и производят отжиг, а затем радиоавтографию. Колонии на исходной чашке, которые содержат гибридизовавшуюся ДНК, выделяют и культивируют.

Репозиторий ВГУ

2. Иммунологический скрининг. В результате экспрессии клонированного гена образуется белок, который можно обнаружить иммунологическими методами. Для этого все клеточные линии (клоны) библиотеки высевают на чашки с питательной средой. Выросшие колонии переносят на фильтр, клетки лизируют, а высвободившиеся белки фиксируют на фильтре. Затем на фильтр наносят первые антитела, которые специфически связываются с данным белком (антигеном). Все несвязавшиеся антитела удаляют, а фильтр помещают в раствор вторых антител, специфичных в отношении первых антител. Во многих тест-системах используют конъюгаты вторых антител с ферментом (например, щелочной фосфатазой). После отмывания фильтра добавляют бесцветный субстрат. Если вторые антитела связываются с первыми, то под действием фермента происходит гидролиз субстрата с образованием окрашенного вещества в том месте, где идет реакция.

3. Скрининг по активности белка. Если искомый ген кодирует фермент, не синтезируемый клеткой-хозяином, то для обнаружения клонов используют цветную реакцию, катализируемую данным ферментом.

В заключение следует отметить, что банки служат источником материала для изучения строения и регуляции индивидуальных генов, а также для исследования структуры и функции белков. С их помощью можно решать проблему сохранения генофонда исчезающих видов [2, 6, 8, 14].

13.7. Направленный мутагенез

Хорошо известно, что основным фактором эволюции и адаптации организмов является наследственная (генотипическая) изменчивость, обусловленая возникновением мутаций и их комбинациями при скрещивании. Спектр мутаций широк, и все их виды (точечные, делеции, инсерции, инверсии) можно осуществлять направленно методами *in vitro*, получая заданное изменение в определенном гене и даже нуклеотиде. А затем направленно измененный ген использовать в технологии рекомбинантных ДНК.

В качестве примера рассмотрим модификацию гена воспроизведением точечной мутации. Различают два типа получения *in vitro* точечных мутаций – сайт-специфический и сегмент-специфический мутагенез.

Мутагенезом называют: 1. Процесс возникновения наследственных изменений (мутаций) под влиянием внутренних или внешних, естественных (спонтанный мутагенез) или искусственных (искусственный, индуцированный или экспериментальный мутагенез) мутагенных факторов. 2. Генетический метод, индукция мутаций в ДНК *in vivo* или *in vitro* путем облучения (радиационный мутагенез) или воздействия химическими веществами (химический мутагенез), путем делеций, инверсий или инсерций последовательностей ДНК (инсерционный мутагенез, транспозонный мутагенез). Мутагенез широко используется в селекции разных организмов.

Сайт-специфический мутагенез используют только в том случае, если известно строение соответствующего участка ДНК. Сайт-

Репозиторий ВГУ

специфический мутагенез реализуется техникой (методом) введения мутаций в специфические сайты клонированной ДНК с помощью мутантных олигонуклеотидов. При этом сайты, в которые вводят мутации, переводят в одноцепочечную форму (например, в составе вектора на основе ДНК фага *M*13). Комплементарную цепь синтезируют *in vitro*, используя в качестве праймера олигонуклеотид, содержащий вводимую мутацию. Бактериальная клетка трансформируется образовавшимся гетеродуплексом, а в результате этапа репликации образуются мутантная и нормальная формы ДНК, которые затем разделяют биохимическими методами [5]. *Сегмент-специфический мутагенез* применяют редко и в тех случаях, когда ясно, какой сегмент гена следует изменить, но не известно, какой нуклеотид конкретно. Простейший способ такого мутагенеза заключается в выделении искомого сегмента в виде рестрикта, обработке последнего каким-либо химическим мутагеном и последующем встраивании в естественное для него место в гене. Затем среди клеток, содержащих рекомбинантные ДНК, отыскивают те, которые приобрели необходимые фенотипические свойства [8].

13.8. Экспрессия чужеродных генов

Экспрессия генов осуществляется путем их транскрипции и трансляции. Эффективность транскрипции зависит, прежде всего, от степени сродства РНК-полимеразы к промотору, а эффективность трансляции – от стабильности иРНК и ее способности связываться с рибосомами. У прокариот (основных клеток-продуцентов в молекулярной биотехнологии) нестабильность иРНК является эволюционно выработанным механизмом их быстрой адаптации к изменяющимся условиям. Поэтому системы транскрипции и трансляции реципиентных клеток должны «узнавать» последовательности нуклеотидов в регуляторных сайтах клонируемых генов. Это достигается путем присоединения чужеродного гена к промотору, сайту связывания рибосом и терминатору транскрипции, специфичным для тех клеток, в которых ген клонируется. Как указывалось ранее, готовый набор этих элементов достигается в экспрессионных кассетах. Как правило, встраивание в такую кассету чужеродного гена приводит к его экспрессии.

В результате экспрессии чужеродных генов на рибосомах синтезируются полипептиды (первичные структуры пептидов или белков). Для их перевода в функционально активное состояние требуется формирование нативной структуры, а для многих эукариотических белков – посттрансляционная модификация. Синтезированные чужеродные белки могут неправильно модифицироваться или не модифицироваться вообще. В таких случаях для клонирования генов используют клетки организмов, родственных тем, откуда были взяты гены [8].

Репозиторий ВГУ

Г Л А В А 14. **ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ И КОММЕРЧЕСКИЕ ПРОДУКТЫ**

Приведем некоторые примеры использования технологии рекомбинантных ДНК для решения проблем экологии человека (анализ генетического материала и некоторые аспекты биотехнологии) [2].

14.1. ДНК-диагностические тесты

ДНК-диагностические тесты основаны на гибридизации нуклеиновых кислот – спаривании двух комплементарных сегментов разных молекул ДНК. Подобные тесты успешно применялись после разработки в 1975 г. технологии Саузерн-блотинга: техника гелевого блотинга, при которой фрагменты ДНК, разделенные по размеру в агарозном гель-электрофорезе, денатурируются *in situ* и переносятся на нитроцеллюлозные фильтры или другие матрицы с помощью электрических или капиллярных сил (Саузерн-перенос). Одноцепочечные нуклеиновые кислоты фиксируются на нитроцеллюлозе путем спекания (иммобилизуются). Гибридизация с определенными радиоактивно или нерадиоактивно меченными зондами позволяет идентифицировать отдельные фрагменты из сложной смеси миллионов других фрагментов.

В основе многих тестов лежит ДНК-фингерпринтинг. Это метод создания фингерпринта (метод «ДНК-отпечатков» по аналогии с отпечатком пальца), для чего: 1) геномная ДНК рестриктируется эндонуклеазами; 2) образующиеся фрагменты разделяются при помощи гелевого электрофореза и переносятся на мембраны из нитрата целлюлозы; 3) производят гибридизацию с мечеными зондами для фингерпринта (ДНК фага *M*13, различные синтетические олигонуклеотиды, кДНК; геномные зонды, содержащие последовательности генов; мини- и микросателлиты ДНК). Зондом называют определенную (известную) радиоактивно и нерадиоактивно меченную последовательность нуклеиновой кислоты, используемой в молекулярном клонировании для идентификации специфических молекул ДНК, имеющих *комплементарные последовательности*. В случае наличия в исследуемой ДНК участков, гомологичных зондам, образуются полиморфные полосы гибридизации, как правило, специфичные для каждого образца ДНК. Это результат полиморфизма длины рестрикционных фрагментов геномной ДНК (ПДРФ). Причиной такого полиморфизма могут быть мутации в пределах сайта рестрикции, повторы ДНК (мини- и микросателлиты) и др. Такие участки (полосы) выявляют мето-

Репозиторий ВГУ

дом радиоавтографии (при использовании меченного зонда) или какой-либо другой системы детекции (обнаружения) нерадиоактивно меченного зонда. Метод может быть использован для генетической идентификации индивидуумов одного вида. Применяется при картировании геномов, выяснении отцовства, в криминалистике [3, 5]. Метод «ДНК-отпечатков» используется для установления различий между растительными культурами. Для характеристики ДНК растений используют набор произвольных олигонуклеотидных праймеров, проводят ПЦР-амплификацию случайных фрагментов ДНК, осуществляют электрофорез и получают специфичный для каждого растения набор полос ДНК (метод RAPD – random amplified polymorphic DNA).

Методы гибридизации нуклеиновых кислот используются при анализе исходного материала (например, выявление определенного микроорганизма) без специального выделения их: проводят гибридизацию с ДНК-мишенями, присутствующими в образцах кала, мочи, крови, смывах из зева, в тканях и объектах окружающей среды. Если концентрация последовательности мишени в исследуемом образце слишком мала, ее можно амплифицировать с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Полимеразная цепная реакция обеспечивает процесс амплификации (размножения) *in vitro*, при котором фрагмент ДНК длиной до 15 кб может быть размножен до 10^8 раз (копий). Для этого синтезируются два олигонуклеотида размером в 10–30 нуклеотидов, комплементарных последовательностям на двух концах исследуемой ДНК. Избыточное количество этих двух олигонуклеотидных праймеров смешивается с геномной ДНК, смесь нагревается для денатурации дуплексов ДНК. При последующем снижении температуры праймеры присоединяются к их геномным гомологам и могут с помощью ДНК-полимеразы удлиниться, т.е. на ДНК-матрице синтезируется вторая цепь. Последовательный процесс (цикл процессов) денатурации, отжига праймера и его удлинения повторяется 20–40 раз. В результате происходит экспоненциальное увеличение копий изучаемой ДНК. За 25 амплификационных циклов количество целевых последовательностей ДНК увеличивается приблизительно в 10^6 раз. Для синтеза новых цепей ДНК используются термостабильные ДНК-полимеразы (*Therminus aquaticus* или *Taq*-полимераза, *Pfu*-ДНК-полимераза, *VentTM*-ДНК-полимераза) [5].

Диагностика специфических наследственных заболеваний человека на генетическом уровне дает ответ на вопрос, входят ли обследуемые индивидуумы или их потомки в группу повышенного генетического риска. ДНК-анализ можно использовать для выявления носителей генов наследственных заболеваний, а также для пренатальной (дородовой) и пресимптоматической (на этапе, когда нет проявлений) диагностики серьезных генетических нарушений, выявлять специфические мутации. ДНК-тесты не требуют экспрессии мутантного гена (т.е. биохимического анализа продукта – белка) для его выявления.

Репозиторий ВГУ

Поэтому интенсивно разрабатываются системы скрининга для всех моногенных заболеваний с использованием ДНК-тестов. Методы молекулярной диагностики постоянно развиваются и находят свое применение в геноэкологических и геногеографических исследованиях.

14.2. Производство белковых лекарств и вакцин

Белковые лекарственный препараты ранее получались в небольших количествах из крови и тканей человека или животных. В настоящее время клонировано более 400 генов различных белков человека (внедренных и потенциальных лекарственных средств). Эти гены вводят в бактерии и экспрессируют. Белковые продукты экспрессии выделяют, очищают и переводят в маркетинговый вид (табл. 14.1).

Таблица 14.1 – Некоторые белки, полученные технологией рекомбинантных ДНК и используемые в медицине и фармации [2]

Рекомбинантный белок	Применение
Кортикотропин (АКТГ)	Ревматизм (лечение)
Альфа-1-антитрипсин	Эмфизема легких (диагностика)
Соматотропин (СТГ)	Задержка роста, работоспособность
Инсулин	Сахарный диабет (лечение)
Инсулиноподобные факторы роста I и II (IGF-I, IGF-II)	Диабет, почечная недостаточность, нарушения роста скелета
Интерлейкины	Злокачественные опухоли, иммунные заболевания
Интерфероны	Вирусные заболевания, злокачественные опухоли, рассеянный склероз
Кальцитонин	Остеомаляция (размягчение костей)
Лимфотоксин	Злокачественные опухоли
Релаксин	Роды
Рецептор интерлейкина-I	Астма, ревматоидный артрит
Соматолиберин	Характер роста
Тиротропин (ТТГ)	Рак щитовидной железы
Тканевой активатор плазминогена	Тромбообразование
Тромбоцитарный фактор роста	Атеросклероз (патогенез)
Фактор некроза опухолей	Злокачественные образования
Фактор роста нервов	Поражения нервной ткани
Фактор роста эпидермиса	Регенерация (заживление тканей)
Фактор VIII, IX	Гемофилия (патогенез)
Факторы роста В-лимфоцитов	Иммунные заболевания
Хорионический гонадотропин	Женское бесплодие
Эндорфины, энкефалины	Боль, эмоции

Репозиторий ВГУ

В настоящее время 2 млрд людей в мире страдают заболеваниями, которые можно было бы предотвратить с помощью вакцинации. В последнее время делаются попытки создать вакцину против белка, переносящего эфиры холестерола в кровеносном русле и играющего важную роль в патогенезе атеросклероза, клинические проявления которого уносят каждую вторую жизнь. Традиционные вакцины содержат инактивированные патогенные микроорганизмы (бактерии или вирусы). Их производство является трудоемким процессом, и они не всегда специфичны. Некоторые вакцины дают побочные эффекты. Вакцины, произведенные технологией рекомбинантных ДНК, лишены ряда недостатков, присущих натуральным вакцинам:

– удаляя гены, ответственные за вирулентность (вызывание заболевания), получают эффективные живые вакцины, применение которых не дает осложнений;

– клонированные гены, кодирующие основные антигенные детерминанты патогенного (болезнетворного) микроорганизма, встраивают в непатогенный носитель (чаще вирус) и получают безопасную вакцину;

– гены или их сегменты, кодирующие основные антигенные детерминанты патогенных микроорганизмов, встраивают в экспрессирующие векторы, переносят их в подходящие клетки-продуценты, получают нужный продукт в большом количестве и используют как вакцину.

14.3. Биодеградация токсических соединений

Примерно 40 лет назад были открыты почвенные микроорганизмы, способные разрушать чужеродные вещества (ксенобиотики). Оказалось, что разные штаммы *Pseudomonas* способны расщеплять более 100 органических соединений. В 1981 году А.М. Чакрабарти получил патент на получение мультиплазмидных микроорганизмов, способных утилизировать несколько соединений. Он взял четыре разные бактерии, каждая из которых имела плазмиду (ДНК), кодирующие определенные ферменты деградации одного вещества, и создал микроорганизм («супербацилла»), содержащий плазмиды, которые обуславливали деградацию четырех веществ: камфары, октана, салицилата и нафталина. Объединяя плазмиды разных штаммов *Pseudomonas* в одном хозяине, можно создать организм, способный деградировать заданный комплекс загрязняющих веществ. С помощью генетических манипуляций можно расширить спектр субстратов, разрушаемых с помощью определенного метаболического пути (модифицируя специфичность ферментов) и подобрать условия ферментативной деградации ксенобиотиков (например, обезвреживание в воде при температуре, близкой к точке замерзания, и др.). Использование технологии рекомбинантных ДНК может сделать процесс обезвреживания токсических

Репозиторий ВГУ

веществ во внешней среде более безопасным и дешевым по сравнению с существующими заводами по утилизации отходов [2].

14.4. Производство продуктов питания

Осуществлено изменение свойств ферментов методами генной инженерии с целью их приспособления для технологических промышленных установок получения фруктозы и этанола, например:

– для получения глюкоамилазы использован штамм пивных дрожжей *S. cerevisiae* с встроенным в хромосому геном глюкоамилазы и устойчивый к высокой концентрации этанола;

– фермент глюкозоизомераза (ксилозо/глюкозоизомераза) получен путем экспрессии этого гена из термофильной бактерии *Thermus thermophilus* в *E. coli* и *B. brevis*, в результате чего в 1000 раз повышается производство ферментативного белка, а сам фермент сохраняет свою стабильность при 95°С;

– с помощью сайт-специфического мутагенеза осуществлена замена двух аминокислот в активном центре глюкозоизомеразы из термофильной бактерии *Clostridium thermosulfurogenes*, что повысило специфичность и каталитическую эффективность фермента (до 17 раз).

Для сбраживания крахмала при промышленном производстве **этанола** используют дрожжи *S. cerevisiae*. В тропических странах для тех же целей применяют бактерию *Zymomonas mobilis* (табл. 14.2).

Таблица 14.2 – Сравнение продуцентов этанола [2]

Показатель	*Z. mobilis*	*S. cerevisiae*
Превращение сахара в этанол, %	96	96
Максимальная концентрация этанола, %	12	12
Скорость продукции этанола, $г \times г^{-1} \times ч^{-1}$	5,67	0,67
Объемная скорость продукции этанола, $г \times л^{-1} \times ч^{-1}$	200	29

Как видно из таблицы, *Z. mobilis* обеспечивает более высокую скорость образования этанола, но число углеродных субстратов для этих бактерий ограничено. В связи с этим в *Z. mobilis* были введены гены ферментов, способных гидролизовать лактозу, крахмал, целлюлозу, ксилозу и целлобиозу. Перспективными для промышленного производства этанола оказались бактерии, в которые ввели гены глюкозо/ксилозоизомеразы и ксилулокиназы, а затем гены транскетолазы и трансальдолазы. В итоге трансформированные клетки утилизировали ксилозу и преобразовывали пентозы до фруктозо-6-фосфата и глицеральдегид-3-фосфата, которые затем превращаются в этанол. Таким

Репозиторий ВГУ

образом, с помощью методов генной инженерии создан микроорганизм – продуцент этанола, который может использовать в качестве источника углерода ксилозу, побочный продукт деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности.

Селекционная работа по улучшению свойств сельскохозяйственных растений является трудоемким и продолжительным процессом. Генно-инженерные методы позволяют намного быстрее получить растения с заданными свойствами (за 2–3 года), а также создать растения со свойствами, не встречающимися в естественных условиях. Были получены кукуруза и горох с улучшенными пищевыми качествами за счет изменения аминокислотного состава запасных белков семян. Созданы сорта масляничных культур с желательным жирнокислотным составом плодов (изменение длины цепи и количества двойных связей). Широкое распространение получили продукты из генетически модифицированной сои.

Улучшение вкусовых качеств фруктов и овощей достигается на этапе приготовления пищи. Придание исходным продуктам необходимого вкуса является актуальной проблемой для биотехнологии пищи. Известно, что в плоде африканского растения *Dioscorephyllum cumminsii* содержится белок монеллин, примерно в 100000 раз более сладкий, чем сахароза в эквимолярных количествах. Этот белок не оказывает вредного воздействия на метаболизм. Монеллин – это двухцепочечный димер, а цепи А (45 аминокислотных остатков) и В (50 аминокислотных остатков) связаны слабыми нековалентными связями. Поэтому этот белок не может быть подсластителем, так как в процессе приготовления пищи (температура, кислоты) димер распадается с утратой вкусовых качеств. В настоящее время синтезирован ген монеллина и получены растения (томаты, салат, цветная капуста и др.), в которые введен данный ген и осуществлена его экспрессия, т.е. синтез монеллина [2].

Репозиторий ВГУ

Г Л А В А 15. **ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ И ЖИВОТНЫЕ. ПРОГРАММА «ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА»**

В этой главе в самом общем виде будут рассмотрены подходы к клонированию многоклеточных организмов, состоящих из высокоспециализированных клеток, особенно высших растений и животных.

15.1. Трансгенные растения

Принято, что «трансген» – это ген, взятый из одного организма и перенесенный в другой организм или клетку. «Трансгенным организмом» называют организм, в геном которого с использованием методов генетической инженерии перенесена чужеродная ДНК, экспрессирующаяся в нем [5].

Разработаны специальные эффективные системы переноса ДНК в растительных клетки (табл. 15.1). Одним из достоинств последних является возможность создания из одной клетки, сконструированной генно-инженерными методами, целого растения, все клетки которого несут чужеродный(-е) ген(-ы) – *трансгенные растения*. Если такое растение цветет и дает жизнеспособные семена, то желаемый признак передается последующим поколениям.

Таблица 15.1 – Методы введения ДНК в клетки растений

Метод	Комментарий
Введение Т-ДНК Ti-плазмид как природных векторов	Эффективная система, но не применимая для всех видов растений
Бомбардировка микрочастицами	Используется для широкого круга растений; метод отличается простотой и дешевизной
Использование вирусных векторов	Не всегда высокая эффективность доставки ДНК в растительные клетки
Прямое введение генов в протопласты растений с помощью созданных на базе Ti-плазмид векторов, способных интегрироваться в растительные хромосомы	Введение генов только в протопласты растительных клеток, из которых могут быть регенерированы жизнеспособные растения. Не у всех видов растений удается добиться регенерации клеток из протопластов, а у многих культурных видов регенерировавшие клетки не являются тотипотентными, т.е. из них нельзя восстановить растение.
Микроинъекции	Ограниченное применение
Электропорация, слияние липосом	Введение генов только в протопласты растительных клеток, из которых могут быть регенерированы жизнеспособные растения

Примечание: 1) протопласт ограничен только плазматической мембраной после ферментативного удаления клеточной стенки; 2) электропорация – кратковременное (5–20 мс) воздействие на клеточную мембрану электрического поля высокой напряженности (1–15 кВ/см) с образованием временных пор [14].

Репозиторий ВГУ

Трансгенные растения имеют следующие преимущества:

– введение гена(-ов) обеспечивает повышение сельскохозяйственной ценности и декоративных качеств культурных растений;

– трансгенные растения могут служить биореакторами для малозатратного производства экономически и биологически важных белков и низкомолекулярных биорегуляторов;

– генетическая трансформация растений позволяет изучать действие генов в ходе развития растений, т.е. получать фундаментальные знания, необходимые для обоснования практических мероприятий по оптимизации сельского хозяйства.

Трансгенные растения получают новые свойства в следующих направлениях: изменение инсектицидной активности; повышение устойчивости к вирусным заболеваниям; изменение устойчивости к гербицидам; замедление старения; повышение устойчивости к неблагоприятным условиям окружающей среды; изменение окраски цветков; повышение пищевой ценности семян.

Для идентификации трансформированных клеток необходимо уметь обнаруживать чужеродную ДНК, интегрировавшую в геномную ДНК растения, а также оценить уровень экспрессии генов. Для этого используют *репортерные гены*. Эти гены, как правило, микробного происхождения, и их вводят поэтому в растительные клетки вместе с сильным растительным промотором. Имеется опыт введения репортерных генов, продукты экспрессии которых видны в целом растении (например, введение гена люциферазы светляков). В системах трансформации чаще всего используется ген β-D-глюкуронидазы *E. coli* (GUS-ген). Он кодирует стабильный фермент, обычно отсутствующий в растениях, который катализирует расщепление β-D-глюкуронидов. Его активность в трансформированных растительных тканях можно обнаружить по появлению синей окраски в результате гидролиза неокрашенного субстрата (5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-глюкуроновой кислоты).

В настоящее время разработаны методы встраивания чужеродных генов непосредственно в хлоропластную или митохондриальную ДНК так, чтобы кодируемый белок синтезировался прямо в этих органеллах [8].

15.2. Трансгенные животные

Введение чужеродной ДНК животным осуществляют несколькими способами:

1. С помощью ретровирусных векторов, инфицирующих клетки эмбриона на ранних стадиях развития перед имплантацией эмбриона в самку-реципиента. Эмбрион, обычно находящийся на стадии 8 клеток, инфицируют рекомбинантным ретровирусом, несущим трансген. Самки, которым был имплантирован эмбрион («суррогатные» матери), производят на свет трансгенное потомство.

Репозиторий ВГУ

2. Микроинъекцией в увеличенное ядро спермия (мужской пронуклеус) оплодотворенной яйцеклетки. У млекопитающих после проникновения сперматозоида в яйцеклетку ядро спермия (мужской пронуклеус) и ядро яйцеклетки существуют раздельно. Мужской пронуклеус обычно гораздо больше женского, его легко локализовать с помощью секционного микроскопа и ввести в него чужеродную ДНК. Это лежит в основе трехэтапного метода получения линий трансгенных животных методом микроинъекций:

1) яйцеклетки выделяют из самок-доноров, у которых была индуцирована гиперовуляция и проведено спаривание с самцами. Гиперовуляция вызывается введением самкам сыворотки беременной кобылы и хорионического гонадотропина человека (увеличивается образование яйцеклеток в 3–7 раз);

2) трансгенную конструкцию инъецируют в мужской пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки;

3) яйцеклетки имплантируют в «суррогатную» мать, которая производит на свет трансгенное потомство.

3. Введением генетически модифицированных эмбриональных стволовых клеток в предимплантированный эмбрион на ранних стадиях развития. Этот метод получил развитие в экспериментах на мышах. Клетки, выделенные из мышиных эмбрионов на стадии бластоцисты, могут пролиферировать в культуре, сохраняя способность к дифференцировке в любые типы клеток. Такие клетки называются плюрипотентными эмбриональными стволовыми клетками (ES). ES-клетки в культуре легко модифицировать методами генетической инженерии без нарушения их плюрипотентности:

1) ES-клетки получают из внутренней клеточной массы бластоцисты мыши;

2) их трансформируют вектором, несущим трансген, культивируют и идентифицируют трансформированные клетки (методом позитивно-негативной селекции или ПЦР);

3) популяцию трансформированных клеток вновь культивируют и вводят в бластоцисты, которые затем имплантируют в матку «суррогатных» матерей.

4) скрещивая животных-основателей, несущих трансген в клетках зародышевой линии, можно получить линии трансгенных мышей (рис. 16.1) [5].

4. Клонированием с помощью переноса ядра. Опыты были поставлены на овцах (у этих животных в течение первых трех делений зиготы, занимающих несколько суток, происходит только репликация ДНК, и ни один из генов не экспрессируется). Клонирование овечки Долли из ядра дифференцированной клетки осуществляли следующим образом:

Репозиторий ВГУ

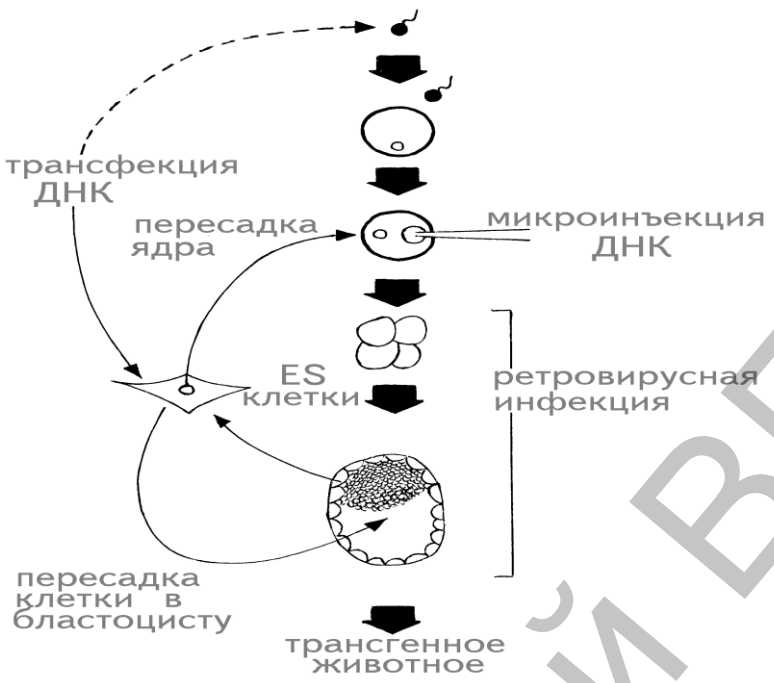


Рис. 15.1. **Пути интродукции чужеродной генетической информации в клетки зародышевого пути** (Гловер, 1989, с изменениями) [6].

1) ядро яйцеклетки удаляли с помощью микропипетки;

2) культивировали эпителиальные клетки молочной железы (дифференцированные клетки) взрослой особи и переводили их в фазу клеточного цикла G_0;

3) осуществляли слияние эпителиальных клеток в G_0-фазе и яйцеклеток, лишенных ядра. Получали яйцеклетки с ядрами от эпителиальных клеток;

4) выращивали восстановленные яйцеклетки в культуре или в яйцеводе с наложенной лигатурой до ранних стадий эмбриогенеза;

5) имплантировали яйцеклетки с ядрами эпителиальных клеток молочной железы в матку «суррогатной» матери, где и происходило развитие плода.

Все перечисленные методы обладают крайне низкой эффективностью и не могут пока найти широкого применения в практике. Так, например, при получении клонированной овечки было проведено слияние 277 яйцеклеток с удаленными ядрами клеток молочной железы в фазе G_0; из 29 эмбрионов только один развился до жизнеспособного плода.

5. Для трансгеноза используют также искусственные дрожжевые хромосомы (YAC), несущие множество генов. Напомним, что дрожжи – это эукариотические клетки, в которых возможна посттрансляционная модификация белков. Таким образом были получены мыши, синтезирующие только человеческие антитела. Их использовали в качестве модельных систем для изучения генетических болезней человека (например, болезни Альцгеймера) [2, 6, 8, 12, 14].

Репозиторий ВГУ

15.3. Программа «Геном человека»

«Геном человека» – это крупномасштабная исследовательская программа, конечной целью которой является полное секвенирование генома человека. Официально работа над программой начата 1 октября 1990 года. Стоимость секвенирования пары оснований около 0,3 доллара США. Планировалось секвенирование примерно 3000 миллионов пар нуклеотидов ДНК за 15 лет. В программе «Геном человека» были использованы и методические подходы генетической инженерии.

Геном был разбит на небольшие участки, примерно по 150 000 пар нуклеотидов в длину. Эти куски затем встраивали в вектор, известный как «Искусственная бактериальная хромосома, BAC». Векторы, содержащие гены, затем вводили в бактерии, где они копировались бактериальными механизмами репликации. Каждый из участков генома затем секвенировали раздельно; все полученные последовательности собирали воедино уже в виде компьютерного текста. Размеры полученных больших фрагментов ДНК, собираемых для воссоздания структуры целой хромосомы, составляли около 150 тысяч пар нуклеотидов. Такая система известна под именем «иерархического метода фрагментирования», потому что вначале геном разбивается на фрагменты разного размера, положение которых в хромосоме должно быть заранее известно.

Геном человека секвенирован досрочно к 2003 г. на 99,99%. Хотя секвенирование ДНК хромосом человека объявлено завершенным в 2006 году, продолжаются исследования последовательности нуклеотидов в областях хромосом, называемых центромерами и теломерами, а также изучаются индивидуальные особенности геномов людей.

В 2004 году исследователи из Международного Консорциума по Секвенированию Человеческого Генома (*International Human Genome Sequencing Consortium* – IHGSC) проекта «Геном человека» огласили новую оценку числа генов в человеческом геноме, составившую от 20000 до 25000 (в начале проекта предполагалось наличие до 2000000 генов). Это число будет еще в течение многих лет уточняться. 4 сентября 2007 года была опубликована нуклеотидная последовательность генома конкретного человека, а спустя год была представлена информация о картировании, секвенировании и структурных особенностях геномов 8 человек. Информация о выполнении программы «Геном человека» незамедлительно публиковалась на страницах журналов Science и Nature.

Интенсивно ведется работа по использованию данных о геноме человека в медицине и биотехнологии. Уже разработаны генетические тесты для оценки предрасположенности человека к опухоли молочных желез, нарушениям свертывания крови, кистозного фиброза и др. Предполагают, что информация о геноме человека поможет поиску причин и способов лечения рака, болезни Альцгеймера и многих других заболеваний. Сопоставление геномов различных организмов открывает новые страницы в теории эволюции, геноэкологии, геногеографии и других смежных науках или областях исследований.

Репозиторий ВГУ

Г Л А В А 16. **ПАТОБИОХИМИЯ КЛЕТОК И БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ**

С биохимических позиций *состояние здоровья* обеспечивают многие тысячи внутри- и внеклеточных реакций организма, определяя его максимальную адаптационную способность. Все патологические процессы и *заболевания* могут вызываться экзогенными или эндогенными неблагоприятными факторами, причем действие всех их реализуется преимущественно через биохимические процессы. Экологическая биохимия связана с медициной: большинство заболеваний могут вызываться восьмью основными причинами и все они реализуются через биохимические процессы: 1) физические агенты (травма, температура, давление, радиация, электричество); 2) химические агенты и лекарства (токсины, ксенобиотики); 3) биологические агенты (вирусы, риккетсии, бактерии, грибы, гельминты); 4) гипоксия (нарушения кровообращения, изменения транспорта кислорода, дыхательные яды); 5) генетические факторы (врожденные, приобретенные); 6) иммунологические реакции (анафилаксия, аутоиммунные заболевания); 7) дисбаланс питания (недостаточное, избыточное, гиповитаминозы); 8) эндокринный дисбаланс (гипо- и гиперфункция эндокринных желез).

Завершая курс экологической биохимии с основами генной инженерии, следует упомянуть о трех интенсивно развивающихся направлениях молекулярной биологии: 1) биохимические механизмы гибели клеток; 2) биохимические механизмы бессмертия клеток (опухолевая трансформация); 3) биохимические механизмы адаптационных процессов [13].

16.1. Молекулярные механизмы гибели клеток

Клетка может погибнуть по механизмам апоптоза или некроза.

Апоптоз – это запрограммированная форма гибели клеток, позволяющая в интересах организма удалить 1) состарившиеся клетки; 2) клетки с повреждениями генома и поэтому потенциально опасные для организма и 3) предшественники клеток в процессе клеточной дифференцировки. *Морфологически* апоптоз характеризуется конденсацией хроматина, фрагментацией ядер, нарушением мембран (блебинг мембран), повреждением органелл клеток, потерей адгезивных свойств, приобретением округлой формы и сморщиванием клеток. *Биохимически* апоптоз характеризуется фрагментацией ДНК высокой молекулярной массы, *межнуклеосомным разрывом ДНК*, выделением фосфатидилсерина и активацией внутриклеточного протеолиза. Изменения мембран и выделение ряда субстанций в окружающую среду обеспечивают привлечение макрофагов и фагоцитоз клетки в состоянии апоптоза.

Репозиторий ВГУ

Апоптоз описан для многих клеток и малых организмов типа нематоды *C. elegans*, является эволюционно консервативным механизмом гибели клеток.

Механизмы апоптоза включают комплекс структурных и биохимических изменений: рецепторы гибели клетки, аспартат-специфичные цистеиновые протеиназы (каспазы), митохондрии, семейство белковых факторов Bcl-2, семейство белков-ингибиторов апоптоза (IAP), ряд биорегуляторов. Апоптоз реализуется двумя путями [20]:

1) внешний путь запускается через рецепторы гибели клеток (действие фактора некроза опухолей – TNF, фактора роста нервов – NGF, индуцирующего гибель сигнального комплекса – DISC и др.) расположенные на поверхности клеток, что ведет к формированию прокаспазы-8 → каспазы-8 → активации эффекторных каспаз -3, -6, -7 → расщеплению макромолекул и фрагментации ядер;

2) внутренний путь регулируется митохондриями и включается токсическими повреждениями генома, гипоксией, свободными радикалами, нарушениями регуляции ростовыми факторами, что ведет к освобождению факторов, индуцирующих апоптоз (цитохрома *c,* Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, апоптоз-индуцирующего фактора – AIF) → комплекс «апоптосома» → прокаспаза-9 → каспаза-9 → активации эффекторных каспаз -3, -6, -7 → расщеплению макромолекул и фрагментации ядер. Итак, оба пути ведут к активации *эффекторных каспаз*, обеспечивающих гидролитическое расщепление ряда макромолекул и проявления морфологических признаков апоптоза.

Белковые факторы Bcl-2, Bcl-x_L ингибируют апоптоз, предотвращая освобождение стимуляторов апоптоза из митохондрий. Активацию эффекторных каспаз предотвращают белки семейства IAP и сурвивин. Для снятия их действия существуют «ингибиторы ингибиторов» – Smac/DIABLO, HtrA2/Omi [20].

Некроз – незапрограммированная гибель клеток, тканей или органов в живом организме. Гибель клеток наступает, когда ее защитные механизмы (микросомальное окисление, репаративный синтез ДНК, антиоксидантная система и пр.) не справляются с повреждениями макромолекул и биорегуляторов. Некроз вызывают механические повреждения, инфекции, опухоли, ишемия, воспаление, окислительный стресс, радиационное воздействие.

16.2. Экологическая биохимия и опухолевый рост

Рак занимает второе место после сердечно-сосудистых заболеваний как причина смерти. С возрастом количество опухолевых заболеваний увеличивается.

Опухолевая клетка характеризуется тремя особенностями: 1) не контролируемый рост, 2) инвазивность в соседние ткани, 3) способность к метастазированию в другие отделы организма.

Репозиторий ВГУ

Морфологические и биохимические изменения при опухолевой трансформации клеток. При действии ряда факторов клетки могут претерпевать опухолевую трансформацию, которая включает: 1) приобретение более круглой формы; 2) потерю межклеточного контакта, ингибирующего рост клеток, что ведет к их неконтролируемому росту; 3) потерю межклеточного контакта, ингибирующего подвижность клеток, ведущего к их инвазивности (в норме подвижность клетки прекращается при ее контакте с другой клеткой); 4) различные биохимические изменения, включая активацию гликолиза, повреждения клеточной поверхности из-за изменений композиции гликопротеинов или гликофосфолипидов, изменение секреции определенных протеолитических ферментов; 5) повреждение структур цитоскелета, таких, как актиновые филаменты; 6) снижение потребности в ростовых факторах и часто повышение секреции определенных ростовых факторов в окружающую среду.

Физические, химические и биологические агенты в патогенезе рака. Известны три основные группы агентов, которые ведут к развитию рака: радиация, химические вещества, вирусы.

1. Различные типы *радиационной энергии* могут быть канцерогенными: ультрафиолетовое излучение, рентгеновское излучение, гамма-излучение. Эти типы излучения повреждают ДНК несколькими путями. Ультрафиолетовое излучение может приводить к образованию пиримидиновых (тиминовых) димеров. Апуриновые и апиримидиновые места могут формироваться при удалении соответствующих пар оснований. Это может привести к одно- и двуцепочным разрывам или к межцепочечным сшивкам ДНК. Действие рентгеновского и гамма-излучений связано с появлением свободных радикалов в тканях: гидроксильный, супероксидный и другие радикалы могут взаимодействовать с ДНК или другими макромолекулами. Эти начальные изменения могут вести к малигнизации тканей и появлению клеток, характеризуемых тремя признаками опухолевых клеток.

2. Многие *химические вещества* являются канцерогенными, их делят на несколько классов: полициклические ароматические углеводороды; ароматические амины; нитрозамины; лекарства; природные компоненты (дантиномицин, афлатоксин B_1); неорганические компоненты (мышьяк, асбест, бериллий, кадмий, хром). Считают, что в 80% возникновения рака у человека виноваты химические вещества окружающей среды. Воздействие этих веществ связано с профессией (бензпирен, асбест), диетой (афлатоксин B_1), образом жизни (курение), приемом лекарств и др. Различают прямые канцерогены (действуют непосредственно на молекулы-мишени) и непрямые канцерогены (требуют предварительной ферментативной активации): проканцероген $\rightarrow$ проксимальные канцерогены (А, В,…) $\rightarrow$ ультимативный канцероген $\rightarrow$ молекула-мишень (ДНК).

Репозиторий ВГУ

Проканцерогены обычно химически неактивны. Метаболизм ксенобиотиков ведет к повышению их растворимости и выведению. Метаболизм химических проканцерогенов тоже ведет к повышению растворимости, но при этом увеличивается *электрофильность*. Метаболизм химических канцерогенов протекает аналогично метаболизму ксенобиотиков в системах микросомального окисления. Интенсивность метаболизма химических канцерогенов зависит от генетических, половых, возрастных и прочих факторов. В результате ферментативной метаболической активации они приобретают свойства (например, электрофильность, т.е. молекула дефицитна по электронам – «+» заряд), позволяющие атаковать молекулы-мишени (электрофильная атака нуклеофильных, т.е. богатых электронами групп ДНК, РНК, белков – «-» заряд).

Основой действия химического канцерогена является ковалентное связывание с клеточными макромолекулами (ДНК, РНК, белки). Наиболее важным является ковалентное связывание канцерогена с ДНК: с пуриновыми, пиримидиновыми основаниями и с фосфодиэфирными группами. Ковалентное связывание прямых и ультимативных канцерогенов приводит к различным типам повреждения ДНК. Благодаря системам репарации ДНК определенное время эти повреждения могут не оказывать канцерогенного действия.

Многие химические канцерогены являются мутагенами, т.е. способны вызывать ряд мутаций. *Мутагенность* химических канцерогенов определяют: 1. В бактериальной системе *Salmonella typhimurium* по мутации в гене, кодирующем ферменты синтеза гистидина (Ames assay). 2. В S-9 фракции (постмитохондриальная фракция печени, содержащая системы микросомального окисления). 3. В целом организме животного. Наиболее дешевым и доступным является Ames assay, который открывает 90% всех канцерогенов.

В развитии канцерогенеза выделяют, по крайней мере, две стадии: 1. Стадия инициации, быстрая, необратимая. Связана с действием химического канцерогена, вызывающего одну или более мутаций (например, нанесение на кожу бензпирена). Эти канцерогены называют инициирующими агентами. 2. Стадия промоции, содействия, когда вещество, называемое промотором, после действия инициатора при хроническом применении ведет к развитию опухоли.

Многие канцерогены способны действовать как инициаторы, так и промоторы. Большое число химических веществ, в том числе фенобарбитал (индуктор цитохрома Р-450), сахарин, могут действовать как промоторы. Наиболее известными промоторами являются кротоновое масло и форболовые эфиры. Один из них – 12-О-тетрадеканоилфорбол-13-ацетат (ТРА) – в качестве рецептора имеет протеинкиназу С, что ведет к фосфорилированию многих мембранных

Репозиторий ВГУ

белков, влияя на транспорт и другие функции. Иными словами, некоторые промоторы действуют на трансмембранные сигнальные системы. Кроме того, после действия инициатора они способны повреждать биосинтез белков.

ДНК – критическая для канцерогенеза молекула-мишень: 1. Опухолевая клетка рождает опухолевую клетку, а это связано с репликацией ДНК. 2. Как излучения, так и химические канцерогены повреждают ДНК и способны вызывать мутации в ДНК. 3. Во многих опухолях найдены ненормальные хромосомы. 4. Очищенная ДНК из опухолевых клеток (онкогены) способна трансформировать нормальную клетку в опухолевую. 5. Некоторые *ДНК и РНК вирусов* являются канцерогенными. Наиболее хорошо изучены вирусы полиомы и SV40. Это малые вирусы (геном около 5 kb), циркулярный геном которых кодирует не больше 5–6 белков. При их попадании в клетку возможна ее малигнизация, поскольку белки этих вирусов (T- и t-подтипы – от слова «tumor») способны тесно связываться с ДНК и нарушать экспрессию генов. Отдельно следует рассмотреть роль онкогенов РНК-содержащих вирусов [13].

Ведущая роль онкогенов в канцерогенезе. Онкогены – это гены, способные вызывать рак. Онкогены открыты у ретровирусов, в частности, у вируса саркомы Рауса. Геном этого вируса содержит 4 гена: 1) (gag) – кодирует группо-специфические антигены вируса; 2) (pol) – кодирует обратную транскриптазу; 3) (env) – кодирует гликопротеины вирусной оболочки; 4) (src) – sarcoma-causing gene – кодирует протеин-тирозин-киназу.

После инициирования клетки вирусом саркомы Рауса, встраивания генома вируса в ДНК хозяина, онкоген src кодирует синтез протеин-тирозинкиназы, которая вызывает ненормальное фосфорилирование ряда белков, в том числе белка винкулина, отвечающего за межклеточное взаимодействие (адгезию). Это ведет к округлой форме клеток, что уменьшает межклеточное взаимодействие. Фосфорилирование некоторых ферментов гликолиза ведет к его активации. Фосфорилирование фосфатидилинозитола запускает фосфатидилинозитольный цикл, в котором образуется два мессенджера: инозитолтрифосфат (IP_3) – освобождает Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума; диацилглицерол (ДАГ) – стимулирует активность связанной с плазматической мембраной протеинкиназы С, которая фосфорилирует ряд белков, в том числе белки ионных насосов мембран (активация Na^+/H^+ системы антипорта). Это ведет к слабому защелачиванию внутриклеточной среды, являющемуся *стимулом к митотическому делению* клеток. Таким образом, онкоген src через протеин-тирозин-киназу и фосфорилирование ряда белков и ферментов ведет к опухолевой трансформации клетки.

Репозиторий ВГУ

Следует отметить, что во многих нормальных клетках имеются белки, обладающие тирозинкиназной активностью. Содержание фосфотирозина в нормальных клетках низкое, но резко повышается после инфицирования онкогенным вирусом. Рецепторы многих ростовых веществ обладают тирозинкиназной активностью, которая стимулируется при связывании ростового вещества с рецептором. Т.о., тирозинкиназная активность играет важную роль в нормальных и трансформированных клетках.

Онкогены других ретровирусов. В настоящее время установлено более 20 онкогенов. Около половины белков, кодируемых ими, являются протеинкиназами, чаще всего тирозинового типа (abc, fes, src). Ростовой фактор из тромбоцитов кодируется онкогеном sis, рецептор эпидермального ростового фактора – онкогеном erb-B, макрофагальный колоний-стимулирующий фактор – онкогеном fms. ДНК-связывающий белок, кодируемый myc-онкогеном, контролирует митотическое деление.

В ДНК нормальных клеток есть последовательности нуклеотидов, сходные или идентичные с последовательностью нуклеотидов вирусных онкогенов. Вероятно, они включались ранее при пассировании вирусов в клетках. Их находят у многих эукариотических клеток (консервативные последовательности). Белковые продукты, кодируемые ими, необходимы на различных стадиях клеточного цикла. Такие гены, присутствующие в нормальных клетках, называются протоонкогены. В опухолевых клетках присутствуют онкогены, способные трансформировать нормальные клетки в опухолевые.

Номенклатура: c-onc (cellular oncogene, например, C-ras) – онкоген, присутствующий в опухолевых клетках; c-onc протоонкоген, (например, C-ras-протоонкоген) – протоонкоген, присутствующий в нормальных клетках; v-onc (viral oncogene, например, V-ras) присутствует в вирусе (если в виде протоонкогена, то пишут v-ras proto-oncogene).

Активация протоонкогенов – это повышение транскрипции гена от нулевого или крайне низкого уровня. При превращении протоонкогена в онкоген, который кодирует синтез какого-то белка, необходимы управляющие участки ДНК (что-то вроде промоторной зоны). Этот процесс играет ключевую роль в канцерогенезе. Возможно 5 механизмов активации протоонкогенов, присутствующих в неактивном виде в геноме клетки: 1) и 2) вставка промотора или энхансера; 3) транслокация хромосом – перенос участка ДНК с одной хромосомы на другую; 4) амплификация гена (усиление до 1000 раз), в том числе и некоторых онкогенов (например, c-ras), участвует в прогрессировании роста и усилении малигнизации; 5) точечная мутация. Белок, кодируемый c-ras протоонкогеном из нормальных клеток и c-ras онкоге-

Репозиторий ВГУ

ном из опухолевых клеток отличается по одной аминокислоте. Но этого отличия достаточно, чтобы у белка – продукта c-ras онкогена опухоли – исчезла ГТФ-азная активность. В результате сохранения ГТФ возникает хроническая активация аденилатциклазы, цАМФ-зависимых протеинкиназ, фосфорилирование белков и дисбаланс метаболизма, что ведет к опухолевой трансформации клетки [13].

Итак, можно суммировать 3 основных пути, которыми продукты онкогенов стимулируют рост:

1. Действие на ключевые внутриклеточные метаболические пути, участвующие в контроле роста (src-протеин-тирозин-киназа, ras-стимуляция аденилатциклазы, myc-ДНК связывающий протеин). Все эти белки контролируют митоз, а первые два – через фосфорилирование регуляторных белков.

2. Продукты онкогенов могут имитировать действие полипептидных ростовых факторов.

3. Продукты онкогенов могут имитировать связывание с рецепторами ростовых факторов.

В настоящее время появились сообщения о том, что некоторые химические канцерогены могут действовать через онкогены.

Митогенетическая роль полипептидных ростовых факторов:

1. Эпидермальный фактор роста (EGF) (слюнная железа мыши) стимулирует рост эпидермальных и эпителиальных клеток.

2. Эритропоэтин (почки, моча) регулирует развитие ранних эритропоэтических клеток.

3. Инсулиноподобные ростовые факторы, I, II (IGF I, IGF II, называемые также соматомедины C и A) (сыворотка) стимулируют включение сульфата в коллаген, митотическое действие на хондроциты, инсулиноподобное действие на клетки.

4. Фактор роста нервов (NGF) (слюнная железа мыши) – действие на симпатические и сенсорные нейроны.

5. Тромбоцитарный ростовой фактор (PDGF) (тромбоциты) стимулирует рост мезенхимальных и глиальных клеток.

6. Трансформирующий фактор (TGF-β) (почки, тромбоциты) – стимулирующий или ингибирующий эффекты на клетки.

Ростовые факторы действуют по 3 путям: 1) действуют подобно гормонам через кровь на клетки-мишени (как эндокринная регуляция); 2) действуют на соседние клетки окружения (как паракринная регуляция); 3) действуют на клетки их образовавшие (как аутокринная регуляция).

Для действия ростовых веществ пептидной природы важно первоначальное связывание с мембранным рецептором. В результате связывания активируются различные пути (протеин-тирозинкиназа, фосфатидилинозитольный цикл, протеинкиназа C, фосфолипаза A_2 и др.),

Репозиторий ВГУ

ведущие к изменению митотической активности ткани. Некоторые из них (PDGF) за короткое время (минута – 2 часа) ведут к активации некоторых клеточных проонкогенов (c-myc, c-fos).

Продукты ряда онкогенов являются или ростовыми факторами или частью их рецепторов. Например, В цепь тромбоцитарного ростового фактора (PDGF) состоит из 109 аминокислот. Онкоген v-sis кодирует 100 из 109 аминокислот В цепи PDGF. Можно предположить, что аутокринная стимуляция тромбоцитарным ростовым фактором – хронический митогенный стимул – является важнейшим фактором в механизме опухолевой трансформации клеток под влиянием v-sis [13].

Роль анти-онкогенов в канцерогенезе. В последние годы открыты гены, подавляющие рост – анти-онкогены (growth-suppressor genes). Потеря этих генов нарушает механизмы контроля роста клеток. Их изучали на модели опухоли ретинобластомы. Ретинобласты – предшественники фоторецепторных клеток. Из 13 хромосомы клеток ретинобластомы исчезает 17 ген Rb (делеция гена). Продукт этого гена ингибирует рост нормальных клеток, но из-за отсутствия гена Rb клетки ретинобластомы делятся неуправляемо. Генетические исследования показали, что ген Rb инактивируется при развитии рака. В настоящее время открыты другие гены, которые тормозят рост клеток и инактивируются при развитии опухолевой трансформации клеток (анти-онкогены, или гены-супрессоры опухолей). Наиболее часто потеря анти-онкогенов обнаруживается при раке молочной железы, почек, легких. В самое последнее время показано, что продукт кодирования гена Rb имеет ядерную локализацию и действует как модулятор экспрессии генов. *Восстановление гена Rb – путь к лечению рака* [13].

Биохимические изменения в опухолевых клетках при прогрессирующем росте. Прогрессирующий рост сопряжен с активацией анаболических процессов, используемых при делении клеток (повышение синтеза РНК и ДНК, повышение мощности аэробного и анаэробного гликолиза) и снижением катаболизма (снижение катаболизма пиримидинов), потерей способности к дифференцировке (появление ферментативных констелляций фетального типа, синтез фетальных белков – раковоэмбрионального антигена), уменьшением синтеза специализированных белков. При неуправляемом росте нарушается регуляция генов и извращается синтез ростовых факторов и гормонов.

Метастазирование – наиболее опасное свойство ростовых клеток. Метастазирование связано с изменением поверхности опухолевых клеток (снижение адгезии, подвижность). При этом ведущую роль играет изменение композиции гликопротеинов и гликосфинголипидов. Для метастазирования важны протеолитические ферменты (4 тип коллагеназы). Кроме того, определенную роль играет потеря одних и появление других антигенов [26].

Репозиторий ВГУ

Роль биохимических лабораторных тестов в диагностике рака. Биохимические лабораторные тесты играют вспомогательную роль в диагностике рака. Многие виды рака ассоциируются с ненормальной продукцией белков, ферментов и гормонов. Их можно определять в сыворотке крови. Такие молекулы известны как *маркеры опухолей* [24]. В настоящее время получило широкое распространение определение следующих молекул:

1. Карциноэмбриональный антиген (CEA) – опухоли толстого кишечника, легких, грудных желез, поджелудочной железы.

2. α-Фетопротеин (AFP) – опухоли печени, зародышевых клеток.

3. Человеческий хорионический гонадотропин (hCG) – опухоли трофобласта, зародышевых клеток.

4. Кальцитонин (CT) – опухоли щитовидной железы (медуллярная карцинома).

5. Простатическая кислая фосфатаза (PAP) – опухоли простаты.

16.3. Экологическая биохимия и адаптация

Адаптация – способность организма видоизменяться в направлении, увеличивающем его шансы на выживание и размножение в данных условиях среды. В адаптационных процессах *центральное место занимают биохимические механизмы*, а именно: качественные и количественные характеристики метаболических функций, ход процессов газообмена, поддержание постоянства внутриклеточной среды (pH, осмотическое давление, онкотическое давление и пр.), использование доступных источников энергии, образование биополимеров. Кроме этих внутриклеточных механизмов в адаптации играют важную роль внеклеточные (внешние) биохимические процессы: люминесценция, выработка сигнальных молекул, химические вещества для нападения, защитные биохимические процессы (свертывание крови, метаболизм ксенобиотиков, репаративный синтез ДНК). Сюда же можно отнести случаи молекулярной мимикрии, когда у паразита образуются антигены, неотличимые от антигенов хозяина.

В любом живом организме имеются биохимические структуры и функции, которые абсолютно необходимы для всех живых систем, но в то же время весьма чувствительны к изменениям физических или химических особенностей среды. Они выполняют в клетке следующие функции:

1. Поддержание структурной целостности макромолекул (ферментов, сократительных белков, нуклеиновых кислот и др.) при их функционировании в изменяющихся условиях.

2. Достаточное снабжение клетки а) энергетической валютой (АТФ, другие макроэргические соединения), б) восстановительными

Репозиторий ВГУ

эквивалентами для биосинтезов (НАДФН) и в) предшественниками для синтеза запасных веществ (гликоген, крахмал, жир), нуклеиновых кислот, белков.

3. Поддержание систем, регулирующих скорости и направления метаболических процессов в соответствии с потребностями организма и их изменениями при изменении условий среды.

Основная задача биохимических адаптаций – это поддержание химического постоянства внутренней среды (гомеостаза) при изменении параметров внешней среды. Это означает, что скорости и направления биохимических реакций подвержены адаптивному регулированию. Рассматривая проблему адаптации, следует сделать уточнение, что результатом адаптации в ряде случаев является не гомеостаз (постоянство состояния), а «энантиостаз» – поддержание функции. Например, фосфолипидный состав биомембран у организмов, адаптированных к холоду или теплу, различен для того, чтобы поддерживать вязкость (текучесть) биомембран, которая определяет функционирование мембраносвязанных ферментов, транспортных систем, рецепторов [11, 22].

16.3.1. Типы адаптивных механизмов («стратегий»)

Выделяют три типа адаптивных механизмов, или «стратегий»:

1. Приспособление *макромолекулярных компонентов* клеток или жидкостей организма. Выделяют два вида такого приспособления: а) изменение количества (концентрации) уже имеющихся типов макромолекул, например, ферментов и б) образование новых типов макромолекул (изоферменты, иммуноглобулины), которые замещают имевшиеся ранее молекулы, не способные эффективно функционировать в новых условиях.

2. Приспособление *микросреды*, в которой функционируют макромолекулы (солевой состав, осмотическое давление, pH).

3. Приспособление на *функциональном уровне*, когда изменение эффективности макромолекулярных систем, в особенности ферментов, не связано с изменением числа имеющихся в клетке макромолекул или их типов. Адаптацию в этом случае обеспечивает изменение в использовании уже существующих макромолекулярных систем в соответствии с потребностями в определенной метаболической активности.

Все три «стратегии» определяют явление метаболической регуляции [11].

Адаптивные изменения ферментных систем. Ферменты выполняют две главные функции: они катализируют биохимические реакции и служат регуляторами обмена веществ. Основные типы адаптивных процессов на уровне ферментов бывают при:

1. Изменениях окружающей среды или переходе к новой стадии развития организма.

Репозиторий ВГУ

2. Изменениях физических факторов среды (температура, гидростатическое давление).

3. Изменениях химического состава среды.

4. При действии факторов, изменяющих активность ферментов (например, гормональная регуляция фосфорилированием-дефосфорилированием апоферментов) или количество ферментов (например, при действии факторов, усиливающих или ослабляющих экспрессию генов, при повышенной чувствительности индуцибельных ферментов к протеолизу).

Адаптация на уровне микроокружения макромолекул. Эволюция биологических растворов, например, цитозолей, состоит в создании окружения, благоприятного для нормального функционирования макромолекул. Эволюция липидного состава мембран может рассматриваться как способ создания оптимальных условий для функционирования мембраносвязанных ферментов. В процессе приспособления к изменяющимся условиям (температуры, давления) липидный состав мембран изменяется для оптимизации работы мембранных белков (ферментов, каналов, насосов). Поэтому можно сформулировать принцип: *путем надлежащей регуляции микроокружения макромолекул для адаптации организма к изменениям внешней среды часто не требуется изменений самих макромолекул.* Это означает, что скорость эволюционного процесса (например, освоение водной среды с иной соленостью) не лимитируется только аминокислотными заменами в структуре белков.

Адаптация путем изменений метаболической активности. Это наиболее быстрый путь адаптации. Его сущность состоит в регулировании функциональной активности макромолекул, ранее синтезированных клеткой. Регулирующие факторы (сигналы) разнообразны по своей природе (изменения температуры, светоосвещенности, pH, действие гормонов, электрических импульсов и др.). Такие сигналы могут изменять интенсивность метаболизма в целом и соотношение между отдельными, часто конкурирующими, путями метаболизма. Подобные реакции могут быть ответом:

1) на изменение энергетических потребностей (или смену источников энергии) при переходе к новому виду деятельности (покой → энергичное движение);

2) на изменение в обеспеченности кислородом, например, у факультативных анаэробов;

3) на воздействие факторов, связанных с миграцией и голоданием, например, при нерестовой миграции лососей или перелетах птиц;

4) на изменение физических условий среды, требующее перестройки метаболизма, например при переходе к зимней или летней спячке;

Репозиторий ВГУ

5) на происходящие повседневно изменения гормонального статуса (острый стресс, хронический стресс, регуляция лактации и др.).

Скорость биохимической адаптации и ее связь с изменяющимися адаптивными механизмами. Временные параметры биохимической адаптации изменяются в очень широких пределах – от длительных периодов, необходимых для эволюционного изменения аминокислотных последовательностей, до долей секунды, за которые может измениться активность уже присутствующих в клетке ферментов. Чем больше времени предоставляется для адаптивных изменений, тем больше выбор возможных стратегий. Рассмотрим варианты адаптации в зависимости от времени, необходимого для ее реализации.

Генетическая адаптация. В тех случаях, когда адаптивный процесс идет на протяжении многих поколений, популяция может использовать все возможные стратегии приспособления, например:

1) мутации регуляторных генов приведут к изменению базальных концентраций ферментов и других молекул, т.е. к количественной макромолекулярной адаптации;

2) аминокислотные замены в белках обусловят появление новых изоферментов или ферментов нового типа;

3) аминокислотные замены в белках могут облегчить выработку новых способов регуляции ферментативной активности, обеспечивающих более адекватную реакцию на сигналы, вызывающие изменения в скоростях метаболических процессов;

4) могут возникать совершенно новые молекулы, придающие организму способность к освоению новых территорий обитания [29].

Классическим примером такого рода адаптаций может служить появление гликопротеиновых и полипептидных «антифризов» у морских костистых рыб, живущих в высоких широтах, благодаря чему эти рыбы (в отличие от других костистых рыб) могут существовать среди льдов.

Акклимация и акклиматизация. Адаптивные реакции этих типов происходят у отдельных особей, но требуют достаточного времени для индукции синтеза новых белков и перестройки фосфолипидов в мембранах. Акклиматизация – это адаптивный процесс приспособления организма к изменению нескольких параметров окружающей естественной среды; акклимация – это приспособление, наблюдаемое в лабораторных условиях, когда все параметры среды, за исключением какого-то одного, поддерживаются на неизменном уровне. Главное отличие этих адаптивных реакций от генетической адаптации состоит в том, что они протекают исключительно на фенотипическом уровне. Для приспособления организма к изменениям среды в этом случае может использоваться только та информация, которая уже содержалась в его геноме с самых первых дней жизни.

Репозиторий ВГУ

Немедленная адаптация. Такого рода биохимическая адаптация происходит настолько быстро, что она не может быть связана с изменениями в экспрессии генов или со значительной перестройкой клеточных структур в результате биосинтетических процессов. Немедленная адаптация нередко осуществляется путем модуляции активности уже имеющихся ферментов. Такое быстрое изменение активности ферментов часто является лишь первой линией обороны от действия неблагоприятных экологических факторов. Со временем на смену этой реакции придут изменения экспрессии генов или затем через ряд поколений к изменениям на генетическом уровне.

Компенсаторная или наступательная адаптация. Биохимическая адаптация в виде количественного и качественного изменения макромолекул, их микроокружения и/или скоростей ферментативных реакций ведет к двум благоприятным последствиям:

1) адаптация может завершиться восстановлением биохимических функций, нарушенных воздействием экологических факторов (компенсаторная адаптация, обеспечивающая стационарное состояние структур и функций);

2) адаптация с использованием радикальных биохимических изменений, придающим новые свойства для выживания и обитания организмов (наступательная, «эксплуатативная» адаптация, играющая важнейшую роль в эволюции, освоении новых территорий, новых источников питания и пр.). В качестве примера могут служить симбиотические отношения между сульфид-окисляющими хемоавтотрофными бактериями и животными в зоне глубоководных термальных источников [11, 22].

16.3.2. Адаптация и метаболизм

В метаболизме выделяют три блока [11, 27, 28].

1. Блок катаболизма, в котором различные метаболиты окисляются до CO_2, H_2O и конечных продуктов азотистого обмена (аммиак, мочевина или мочевая кислота). В процессе переноса электронов и протонов от субстратов окисления на кислород образуется вода, а выделяемая при этом энергия аккумулируется в виде АТФ (до 40%), а остальная энергия рассеивается в виде тепла. При недостатке или отсутствии кислорода электроны переносятся на различные органические соединения, которые восстанавливаются и накапливаются в клетке в качестве конечных продуктов обмена (например, превращение пирувата в лактат при мышечной работе). Важнейшие метаболические пути этого блока – гликолиз, бета-окисление жирных кислот, цикл трикарбоновых кислот, пути распада аминокислот. Конечные продукты блока катаболизма у прокариот выделяются в окружающую среду, а у эукариот имеются специальные системы выведения, обезвреживания и реутилизации.

Репозиторий ВГУ

2. Блок анаболизма представлен процессами, протекающими с потреблением АТФ: биосинтез предшественников и низкомолекулярных биорегуляторов, функциональных биополимеров, резервных молекул. В этом блоке источником восстановительных эквивалентов в биосинтезах является НАДФН.

3. Блок роста и дифференцировки – образование информационных и структурных макромолекул, надмолекулярных структур, органелл клетки. В этом блоке чаще используются другие макроэргические соединения – ГТФ в биосинтезе белков, УТФ в биосинтезе углеводов, ЦТФ в биосинтезе липидов.

Основными сопрягающими молекулами этих трех блоков являются АТФ и НАДФН. Блоки катаболизма и анаболизма сопряжены с помощью 10 веществ: четырех типов «сахарофосфатов» (фосфотриозы, тетрозофосфат, пентозофосфат, гексозофосфат), трех 2-оксокислот (пируват, оксалоацетат, 2-оксоглутарат) и двух активированных карбоновых кислот (ацетил-КоА и сукцинил-КоА) и фосфоенолпируват. Во втором блоке эти вещества превращаются в другие соединения, поэтому они должны постоянно поставляться блоком 1. Из второго блока в третий поступают различные мономеры, которые будут использоваться для синтеза полимеров. Продукты третьего блока (гены, белки, мембраны, органеллы) обеспечивают функционирование всех трех блоков.

Биохимическая адаптация возможна во всех трех блоках:

1. В блоке 1 через изменение путей образования АТФ (субстратное или окислительное фосфорилирование АДФ) и скоростей образования АТФ.

2. В блоке 2 через изменение качества и количества синтезируемых мономеров путем переключения метаболических путей.

3. В блоке 3 через изменение структурных и функциональных особенностей клетки.

В эволюционном отношении наиболее древним путем освобождения энергии из глюкозы (или ее резервной формы гликогена) является анаэробный гликолиз, который включает 11 реакций превращения глюкозы в молочную кислоту. Механизмы биохимической адаптации включают изменения на уровне резервирования и мобилизации гликогена, превращений триозофосфатов, фосфоенолпирувата и пирувата.

Содержание гликогена в разных тканях существенно различается: 4–6% в печени, до 1% в мышцах и практически полное отсутствие в нервной ткани. Высокое содержание гликогена характерно для печени золотой рыбки и черепах, сердечной мышцы тюленя или мышечной ткани двоякодышащих рыб. Для биохимической адаптации ведущую роль играют каскадные механизмы мобилизации гликогена, запускаемый адреналином, и механизмы синтеза гликогена. Ведущую роль в таких адаптационных механизмах играют процессы химиче-

Репозиторий ВГУ

ской модификации фосфорилазы и гликогенсинтазы методом фосфорилирования-дефосфорилирования.

После расщепления Ф-1,6-БФ альдолазой образуются фосфотриозы. Дигидроксиацетонфосфат с помощью фермента α-глицерофосфат-дегидрогеназы превращается в α-глицерофосфат, который затем используется для биосинтеза триацилглицеролов. В анаэробных условиях из-за высокой активности этого фермента (например, в летательных мышцах некоторых насекомых) возникает конкуренция между путями превращений фосфотриоз в гликолизе или в биосинтезе липидов. В результате возникает опасность, что только половина углеродных атомов, входящих в состав глюкозы, будет переходить в пируват с попутным образованием двух молекул АТФ. Если учесть, что на ранних этапах гликолиза расходовались две молекулы АТФ, то общая эффективность процесса окажется равной нулю. Поэтому требуется тщательное регулирование α-глицерофосфат-дегидрогеназы.

Зрелый эритроцит млекопитающих полностью удовлетворяет свои энергетические нужды за счет анаэробного гликолиза. В эритроцитах в связи с их функцией происходит переключение гликолиза на уровне 1,3-бисфосфоглицерата. Этот метаболит может превращаться в гликолизе в 3-фосфоглицерат (выделяется АТФ) или в 2,3-бисфосфо-глицерат, который уменьшает связывание кислорода гемоглобином. Содержание 2,3-бисфосфоглицерата в крови высокое (6 мкмоль/мл крови). Очевидно, что образование 2,3-бисфосфоглицерата идет в обход фосфоглицераткиназной реакции и АТФ не образуется. Следовательно, клетке приходится расплачиваться за это отклонение от пути гликолиза потерей энергии в случае избыточного накопления 2,3-бисфосфоглицерата.

У многих беспозвоночных (гельминтов, аннелид, морских двустворчатых моллюсков) классический путь гликолиза существенно видоизменен на уровне фосфоенолпирувата, который может либо карбоксилироваться с образованием оксалоацетата, либо превращаться в пируват. Образующийся оксалоацетат часто восстанавливается до сукцината, который в анаэробных условиях может накапливаться как конечный продукт. В некоторых случаях оксалоацетат образуется также из аспартата и при определенных окислительно-восстановительных условиях окисляется вместе с глюкозой. При таких условиях распад как глюкозы, так и аспартата приводит к накоплению сукцината. Такой принцип параллельного сбраживания углеводов и аминокислот реализуется у представителей различных групп животных. У некоторых организмов (гельминтов, например *Fasciola*, аннелид, например, *Arenicola*) сукцинат может затем превращаться в пропионат. Этот путь образования пропионата сопровождается в отличие от гликолиза в 3 раза большим образованием энергии: сукцинат → сукцинил-КоА → метилмалонил-КоА → пропионил-КоА → пропионат.

Репозиторий ВГУ

Разнообразные модификации гликолиза встречаются на его заключительных этапах. В гликолизе пируват превращается в лактат и эта реакция необходима для поддержания ОВП. У ряда гельминтов пируват превращается в ацетат или этанол (ткани золотой рыбки и личинок *Chironomus*). Возможны превращения пирувата в разнообразные аминокислоты (лизопин, октопин) путем восстановительной конденсации с соответствующей аминокислотой. У беспозвоночных для этого чаще используется аргинин, аланин, глицин, лизин. Это реакции сопряжения путей распада углеводов и аминокислот у беспозвоночных животных [11, 22].

Итак, согласно В.Н. Ярыгину (2002), в основе эволюции лежит *приспособительное свойство* живых форм. *Адаптация* – это структурная, функциональная или поведенческая особенность живой системы, повышающая ее шансы на успех в соответствующем местообитании. На популяционном уровне выделяют четыре типа адаптаций, различающихся по уровню реализации и обеспечиваемому результату. Поведенческие адаптации реализуются на уровне целостного организма и обусловливают выживание в определенной среде и использование ее ресурсов; анатомические реализуются на уровне структур и обеспечивают заданный образ жизни; физиологические адаптации реализуются на уровне жизненных функций, приводя к соответствию организма условиям среды обитания; *биохимические адаптации реализуются на уровне метаболических функций, гарантируя реальность аналогичных функциональных отправлений в различающихся условиях среды жизни*. Отсюда, здоровье, мерой которого является жизнеспособность, является интегральным показателем приспособительного потенциала (генеральная адаптация) живого существа.

Репозиторий ВГУ

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бокуть, С.Б. Молекулярная биология: молекулярные механизмы хранения, воспроизведения и реализации генетической информации: учеб. пособие / С.Б. Бокуть, Н.В. Герасимович, А.А. Милютин. – Минск: Выш. шк., 2005. – 463 с.
2. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
3. Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии / Г.Г. Гончаренко. – Минск: Выш. шк., 2005. – 183 с.
4. Егорова, Т.А. Основы биотехнологии / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М.: ACADEMIA, 2003. – 208 с.
5. Картель, Н.А. Генетика. Энциклопедический словарь / Н.А. Картель, Е.Н. Макеева, А.М. Мезенко. – Минск: Тэхналогія, 1999. – 488 с.
6. Кузнецов, А.В. Подвижный вектор / А.В. Кузнецов, И.В. Кузнецова. – М., 1998. – 189 с.
7. Куценко, С.А. Основы токсикологии: Научно-методическое издание / С.А. Куценко. – СПб: ООО «Издательство Фолиант», 2004. – 720 с.
8. Рыбчин, В.Н. Основы генетической инженерии / В.Н. Рыбчин. – СПб.: Издательство СПбГТУ, 2002. – 522 с.
9. Телитченко, М.М. Введение в проблемы биохимической экологии: биотехнология, сельское хозяйство, охрана среды / М.М. Телитченко, С.А. Остроумов. – М.: Наука, 1990. – 288 с.
10. Фелленберг, Г. Загрязнение природной среды. Введение в экологическую химию. – М.: Мир, 1997. – 232 с.
11. Хочачка, П. Биохимическая адаптация / П. Хочачка, Дж. Сомеро. – М.: Мир, 1988. – 568 с.
12. Чиркин, А.А. Основы генной инженерии: методы рекомбинантных ДНК / А.А. Чиркин. – Витебск: УО «ВГУ им. П.М. Машерова», 2005. – 134 с.
13. Чиркин, А.А. Биохимия. Учебное руководство / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. – М.: Медицинская литература, 2010. – 624 с.
14. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2004. – 496 с.
15. Элиот, В. Биохимия и молекулярная биология / В. Элиот, Д. Элиот. – М.: Изд-во НИИ Биомедицинской химии РАМН, ООО «Материк-альфа», 1999. – 372 с.
16. Berg, J.M. Biochemistry / J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer. – N-Y: W.H. Freeman and Company, 2002. – 1514 p.

Репозиторий ВГУ

17. Champe, P.C. Biochemistry / P.C. Champe, R.A. Harvey, D.R. Ferrier. – Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2005. – 534 p.
18. Chesworth, J.M. An Introduction to Agricultural Biochemistry / J.M. Chesworth, T. Stuchbury, J.R. Scaife. – London: Chapman and Hall, 1998. – 490 p.
19. Davidson, V.L. Biochemistry / V.L. Davidson, D.B. Sittman. – Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 1999. – 479 p.
20. Ganten, D. Encyclopedic reference of genomics and proteomics in molecular medicine. Vol. 1–2 / D. Ganten, K. Ruckpaul. – Berlin: Springer-Verlag, 2006. – 4180 p.
21. Harborne, J.B. Introduction to Ecological Biochemistry. Fourth Edition / J.B. Harborne. – London: Academic Press, 1993. – 318 p.
22. Hochachka, P.W. Biochemical Adaptation. Mechanism and Process in Physiological Evolution / P.W. Hohachka, G.N. Somero. – Oxford: University Press, 2002. – 466 p.
23. Kaplan, L.A. Clinical chemistry. Theory, analysis, and correlation / L.A. Kaplan, A.J. Pesce, S.C. Kazmierczak. – St. Louic, Baltimore: Mosby, 1996. – 1211 p.
24. Karp, G. Cell and molecular biology. Concepts and experiments / G. Karp. – John Wiley and Sons, 2005. – 780 p.
25. Marshall, W.J. Clinical Biochemistry. Metabolic and clinical aspects / W.J. Marshall, S.K. Bangert. – New York: Churchill Livingstone, 1995. – 854 p.
26. Murray, R.K. Harper's Biochemistry, twenty-third edition / R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell. – Appleton and Lange, 1993. – 806 p.
27. Nelson, D.L. Lehninger principles of biochemistry / D.L. Nelson, M.M. Cox. – New York: Worth Publishers, 2000. – 1152 p.
28. Voet D., Voet J.G. Biochemistry / D. Voet, J.G. Voet. – New York: John Wiley and Sons. Inc., 1995. – 1360 p.
29. Weiss, K.M. Genetics and the Logic of Evolution / K.M. Weiss, A.V. Buchanan. – A John Wiley and Sons, Inc., Publication, 2004. – 541 p.

Репозиторий ВГУ

Репозиторий ВГУ