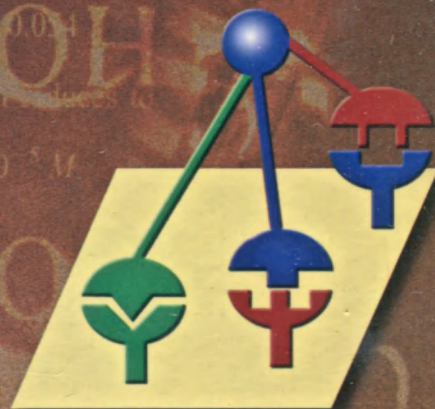
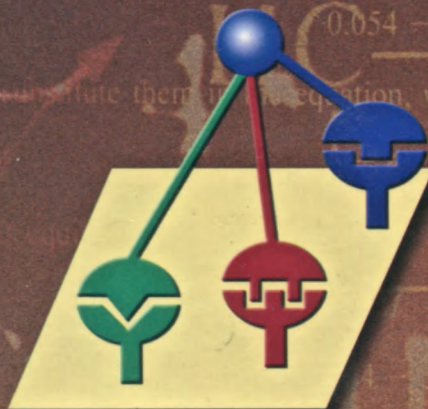


ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

Н. Я. Головенко



ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ



ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
ИМ. А. В. БОГАТСКОГО НАН УКРАИНЫ

Н. Я. ГОЛОВЕНКО

Физико-химическая фармакология

Одесса
«Астропринт»
2004

ББК 58.81

Г61

УДК 573.7:612.603

В монографии освещаются вопросы всасывания, распределения, метаболизма, элиминации лекарственных средств и биологического ответа на их введение (LADMER). Обосновано понятие физико-химической фармакологии как научного направления науки о лекарствах, объектом которого являются структура, физические, химические и физико-химические свойства биологически активных веществ и их мишеней. Установлены общие закономерности, дана количественная оценка и объяснены механизмы реализации процессов LADMER. Обобщены основные принципы и методические подходы, используемые в физико-химической фармакологии для рационального конструирования, скрининга и синтеза новых (оригинальных) лекарственных средств.

Книга является унифицированным руководством по изучению лекарственных средств и ксенобиотиков.

Рассчитана на фармакологов, токсикологов, биохимиков, физиологов, патологов, врачей, научных сотрудников, студентов и аспирантов химических, фармацевтических, биологических и медицинских специальностей.

Рецензенты:

С. А. Андронати, д-р хим. наук, профессор,
академик НАН Украины;

А. В. Стефанов, д-р биол. наук, профессор,
академик АМН Украины

Рекомендовано к печати Ученым советом
Физико-химического института
им. А. В. Богатского НАН Украины.

Протокол № 1 от 12 марта 2004 г.

Г 4107030000—119 Без объявл.
318—2004

ISBN 966 — 318 — 206 — 7

© Н. Я. Головенко, 2004

ВВЕДЕНИЕ

Душа да устремится к небесам
На фоне пролетающего века
Пусть разуму и пусть людским рукам
Откроются все таинства молекул,
Способным людям лишь добро дарить
И, победив одну болезнь, не вызывать иные
И лишь тогда мы сможем говорить
Ушла из жизни идиосинкразия.

*The Pharmacologic Principles
of Medical Practice (1954)¹*

Эта цитата, приведенная в работе Кранца и Карра еще 50 лет тому назад, показывает насколько значительными были наши знания об изменчивости ответа организма на лекарственную терапию. Большинство часто употребляемых лекарств безопасно для пациентов, однако вследствие многообразия индивидуального ответа побочные эффекты все же встречаются.

Возможность предвидеть и в последующем избежать неблагоприятных осложнений — основная задача экспериментальных и клинических фармакологов, как по отношению к ныне существующим, так и к новым (оригинальным) препаратам. Поэтому необходимо знать большинство моментов взаимодействия лекарства с организмом, начиная с поступления и до его выведения.

В классической фармакологии последовательность процессов, объясняющих биологическую активность лекарственных средств, условно представляют тремя фазами: 1) фармацевтической, которая включает процессы высвобождения субстанции

¹ Перевод профессора Э. И. Иванова.

с определенной формы препарата. В ней поддерживается соответствующая концентрация активного ингредиента, для последующего всасывания. Нередко эту фазу квалифицируют как процесс биофармацевтической доступности; 2) фармакодинамическая фаза определяет биологические и терапевтические эффекты, обусловленные действием препаратов на биологические мишени (рецепторы, ферменты, гены и др.); 3) фармакокинетическая фаза — промежуточное звено между предыдущими этапами. Она изучает процессы всасывания, распределения, метаболизма и элиминации лекарственных средств.

Следовательно, фармакология, как наука занимается изучением действия препаратов на жизненные процессы, где конкретно фармакодинамика уделяет основное внимание механизмам действия лекарств, а фармакокинетика — влиянию организма на препарат. Очевидно, знание фармакодинамики является необходимым фактором для выбора препарата. Однако даже правильно подобранное средство может быть недостаточно эффективным или, наоборот, вызвать нежелательное действие если его окажется в биофазе слишком много или мало, или период его воздействия слишком короток, или наоборот, слишком продолжителен. Лекарственная терапия может быть неэффективна как по фармакодинамическим, так и по фармакокинетическим причинам.

Оперирование в научной литературе тремя вышеуказанными фазами становится все более проблематичным. Объясняется это, прежде всего, отсутствием четко выраженных границ между ними, что затрудняет проведение анализа полученных результатов. Поэтому в последнее время широкое распространение получил новый термин, характеризующий отдельные звенья взаимодействия лекарственного средства с организмом. Он используется в англоязычной литературе и обозначается LADMER (Liberation, Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination, Response), т. е. включает элементы биофармации, фармакокинетики и фармакодинамики:

Процесс	Дисциплина
L-высвобождение <i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Биофармация
A-всасывание	
D-распределение	Фармакокинетика
M-метаболизм	
E-элиминация	Фармакодинамика
R-эффект	

Отметим, что биофармация относится как к фармацевтической, так и к фармакологической науке. В широком смысле она изучает взаимосвязь между физико-химическими свойствами лекарства в его определенной форме и фармако-токсикологическим, а также терапевтическим действием на организм. Однако основным критерием, используемым в биофармации является процесс всасывания вещества и определение биодоступности. В тоже время, процессы всасывания лекарства относятся и к компетенции фармакокинетики, которая в системе LADMER имеет свою определенную часть (ADME). Если она рассматривает вопросы массопереноса молекул лекарственного вещества в отдельных частях и в целом организме, то ее относят к классической фармакокинетике и обозначают ADME/PK. Если изучаются процессы образования реакционноспособных метаболитов, приводящих к цитотоксичности лекарств, — то это ADME/*t*. В случае метаболической активации фармакодинамического действия соединений (пролекарства) — ADME/PD.

Учитывая основные положения физики и химии, поведение лекарства в организме подчиняется трем закономерностям: 1) связыванию (рецепции) с макромолекулами; 2) способности к передвижению или массопереносу; 3) биотрансформации.

Прогресс в фармакологии характеризуется непрерывным поиском и созданием новых и более совершенных препаратов.

В последнее время для решения этих задач все большее значение приобретают фундаментальные исследования. Они касаются как химических проблем (теоретическая химия, физическая химия, органическая и физико-органическая химия) так и сугубо биологических исследований. Успехи молекулярной биологии и генетики, биохимии, биофизики и физиологии стали существенным образом сказываться на таком прикладном аспекте фармакологии, как создание новых, оригинальных препаратов. Действительно, открытие новых эндогенных лигандов, вторичных передатчиков, пресинаптических рецепторов, выделение отдельных рецепторов, разработка методов исследования функций ионных каналов, успехи генной инженерии и т. п. — сыграли решающую роль в конструировании новых лекарственных средств.

Физическая химия широко использует теоретические и экспериментальные методы физики при исследовании химических явлений. Так, термодинамический метод применяется для решения проблемы направленности процессов химического и фазового равновесия, а метод молекулярно-кинетической теории — при определении свойств систем, состоящих из множества частиц (растворы).

Исследователь в области физической химии старается предсказать химические эффекты, исходя из определенных моделей и постулатов. Поскольку встречающиеся в фармакологии проблемы весьма разнообразны и сложны, например, построение фармакокинетической модели, для их решения приходится прибегать к различным физико-химическим подходам.

Методы органической и физико-органической химии наряду с физической химией широко используются для определения закономерности структура-активность.

Структура химического соединения может быть представлена в виде структурной химической формулы, в виде электронной структуры, характеризующейся определенным набором квантовохимических индексов и, наконец, в виде трехмерной структуры, описываемой координатами атомов в трехмерном

пространстве и связями между ними. Косвенно структура химического соединения может быть охарактеризована ее физико-химическими свойствами. Структурная химическая формула обычно получается экспериментальным путем, все последующие описания структуры и ее свойств могут быть получены расчетными или полужемпирическими методами. Биологическая активность тестируемого соединения связывается со структурой или ее свойствами на основе статистических подходов (показатели сходства определенного числа фрагментов тестируемого соединения и соединения с известной биологической активностью; регрессионные уравнения, связывающие структурные характеристики и биологическую активность и т. п.), а также на основе эвристических подходов, предполагающих наличие выявленных научных закономерностей (или гипотез), связывающих структуру и активность.

В совокупности различные способы определения связи «структура-активность» образуют один из важнейших методологических подходов для выявления биологической активности химических соединений, который в большинстве случаев осуществляется на основе применения электронно-вычислительной техники и соответствующего математического обеспечения.

Исходя из вышеизложенного, нам кажется оправданным использовать термин физико-химическая фармакология, подразумевая ее как составную часть таких устоявшихся наук, как физико-химическая биология и медицинская химия.

В историческом аспекте физико-химическая фармакология начала развиваться и сложилась как наука о лекарствах в основном в конце XX ст. На современном этапе развития область, охватываемая физико-химической фармакологией, расширилась настолько, что границы между этим направлением науки и другими химическими и биологическими дисциплинами постепенно стираются.

В настоящее время физико-химическая фармакология охватывает широкий круг исследований и сам предмет может быть определен как научное направление, изучающее

структуру, физические, химические и физико-химические свойства биологически активных веществ и их мишеней с целью установления общих закономерностей, количественного описания и объяснения механизмов реализации процессов LADMER.

Объекты исследований, находящиеся в компетенции физико-химической фармакологии, перечислены в Главе 1 (табл. 1.1).

В большинстве случаев терапевтическое и токсическое действие лекарств остается за пределами физико-химической фармакологии. Однако, многие общие механизмы таких проявлений успешно решаются с ее помощью (Глава 10).

Главы, посвященные непосредственному анализу структуры LADMER (5—9, 11), фармако-токсикологической проблеме ADME (Глава 10), а также применению принципов и подходов физико-химической фармакологии в конструировании и изучении новых лекарственных средств (Глава 12) требуют определенных знаний в области термодинамики, химической кинетики и ферментативного катализа, кислотно-основных свойств лекарств и их связывания с биологическими макромолекулами. Поэтому эти фундаментальные положения кратко освещены в Главах 1—4. Они могут быть прочитаны до ознакомления с Главами 6—12 или во время работы с последними, где имеются ссылки на необходимую информацию, содержащуюся в Главах 1—4.

Специальных замечаний требует система библиографических ссылок. Стремясь к тому, чтобы книга читалась легко, мы решили не прерывать изложение многочисленными ссылками на литературные источники. Мы также старались избежать многочисленных рассуждений, связанных с тщательным взвешиванием всех «за» и «против», которыми изобилуют традиционные монографии. Каждая глава снабжена тщательно отобранным списком обзорных статей или монографий, дающих полную картину развития проблемы. Кроме того, приводится список последних оригинальных работ, обсуждаемых в тексте и отражающих, по мнению автора, наиболее существенные из современных экспериментальных данных.

Следует отметить, что, как всякая новая область науки, особенно это касается Главы 12, физико-химическая фармакология не обладает устоявшейся, универсальной терминологией, что существенно затрудняет обзорное изложение материала. Тем не менее, в данной монографии предпринята попытка представить основные аспекты в более унифицированной терминологии, вобравшей в себя самые удачные и точные на наш взгляд формулировки, рекомендуемые IUPAC: 1) Glossary of terms used in medicinal chemistry, IUPAC recommendations // Pure and Appl. Chem. — 1998, 70. — P. 1129—1143; 2) Annual reports in medicinal chemistry. — N-Y., Academic Press. — 1998. — Vol. 33. — P. 385—409.

Книга предназначена не только для научных работников, занимающихся экспериментальной фармакологией, физиологией, биохимией ксенобиотиков, молекулярной биологией и генетикой, биоорганической химией, но также для студентов и аспирантов, интересующихся данными проблемами. Мы поставили перед собой цель создать обобщающую сводку достижений многих лабораторий и изложить различные точки зрения. Кроме того, книга может служить ключом к изучению всей литературы в рамках LADMER, которая необходима исследователям, работающим в этой области.

Полагаю своим приятным долгом выразить глубокую признательность сотрудникам, с которыми мне пришлось долгое время работать в Одесском национальном университете им. И. И. Мечникова и Физико-химическом институте им. А. В. Богатского НАН Украины докторам биологических наук Б. Н. Галкину, О. В. Жук, В. Г. Зиньковскому, Т. Л. Карасевой, Т. О. Филипповой, принимавшим участие в экспериментальных работах по большинству разделов физико-химической фармакологии, составивших определенную часть фактического материала книги. Вклад в сбор данных и оформление глав книги внесли М. С. Жук, С. А. Силантьев, С. И. Щукин, И. Ю. Борисюк, С. К. Сумрий, Е. Г. Лобашова. Всем названным коллегам по работе автор приносит глубокую благодарность. Считаю своим

долгом выразить глубокую признательность академику НАН Украины С. А. Андронати, академикам РАМН С. Б. Середенину, А. И. Арчакову и Л. А. Тиунову за постоянный интерес и внимание к рассматриваемым в книге проблемам, полезную критику в обсуждении полученных данных.

Буду признателен всем читателям, сообщившим мне свои замечания, касающиеся данного издания.

ТЕРМОДИНАМИКА

Несмотря на большое разнообразие показателей (табл. 1.1), обеспечивающих понимание взаимодействия лекарственных средств с организмом, объединяющим моментом для них может быть термодинамический подход. Живые организмы динамичны по своей природе; они включают множество взаимосвязанных и взаимозависимых биохимических реакций, которые, как правило, находятся в состоянии равновесия, но довольно часто протекают в стационарном режиме. Если рассматривать отдельный организм или клетку как термодинамическую систему, то сразу становится ясным, что такая система в терминах термодинамики является открытой, так как она обменивается веществом, в том числе и лекарством, и энергией со своим окружением.

Классическая термодинамика изучает превращения энергии одного вида в энергию другого вида и соотношения между экспериментально определяемыми величинами, которые характеризуют систему в равновесии. Термодинамика образует основу для количественного описания влияния температуры, давления и концентрации на положение химического равновесия. В термодинамике не рассматриваются скорости, с которыми происходят те или иные процессы. В классической термодинамике время отсутствует; оно вводится, однако, в так называемой неравновесной термодинамике, или термодинамике необратимых процессов. Далее, термодинамические соотношения не зависят от предположений о молекулярной природе вещества и, строго говоря, не дают никакой информации о механизме химических или биохимических реакций. Они характеризуют только изменения при переходе из начального в конечное состояние. Тем не менее в руках физикохимиков понятия гиббсовской свободной

Таблица 1.1

**Основные показатели физико-химической фармакологии, используемые
в процессе создания и изучения лекарственных средств**

Наука или научное направление	Разделы	Показатели
Химия	Структура и физико- химические свойства	Химическая структура, название вещества и его синонимы, липофильность, молекулярная масса, топологическая и топографическая характеристика, изомерия, чистота, спектральные свойства и др.
Биология	Методы анализа (биохимические, фармакологические) механизмы	Константы ингибирования (K_i , IC_{50} , процент изменения концентрации), коэффициент Хилла, кривые титрования. Номенклатура белков (переносчики, ферменты, рецепторы) кофакторы ферментов, клеточная компартментализация, посттрансляционная модификация, протеомика, геномика.
Структурная биология	Методы, структурная характеристика	Экспериментальные методы (рентгеноструктурный анализ, ЯМР), методы очистки белков, установление структуры и чистоты, системы экспрессии (вектор, насекомые, бактерии). Мультидоменная организация белков, семейства.
ADME	Методы анализа	Физико-химические, иммунологические, микробиологические, и др. методы анализа. Определение свободной и связанной с белками фракции, печеночный клиренс, индукция и ингибирование ферментов, метаболизирующих лекарства. Фармакокинетическое моделирование (ADME/PK), цитотоксичность (ADME/t), пролекарства (ADME/PD).
Геномика протеомика, транскриптомика	Фармакогенетика, токсикопроотемика	Секвенирование нуклеотидов и белков, структура генов, однонуклеотидные замены (SNPs), профиль дисперсии, тканевое распределение.
Компьютерные технологии	Хемоинформатика, биоинформатика	<i>In silico</i> : скрининг, конструирование и синтез биологически активных веществ, расчет дескрипторов, QSAR

энергии, энтальпии и энтропии, относимые к отдельным видам атомов и молекул в строго определенных стандартных состояниях, сыграли и продолжают играть ключевую роль при рассмотрении различных физико-химических процессов, происходящих в организме.

Термодинамика использует обозначения, необходимые для записи уравнений, в которых имеет место понятие теплота и другие формы энергии. Приведенные ниже символы отражают следующие термодинамические понятия: E — внутренняя энергия, H — энтальпия (теплосодержание), S — энтропия, G — свободная энергия Гиббса, ω — работа, q — теплота.

Термодинамические понятия связаны следующими фундаментальными уравнениями, которые могут быть представлены в самой простой форме в таком виде:

1. $H = E + PV$;
2. $G = H - TS$;
3. $dE = TdS - PdV$;
4. $dH = TdS + VdP$;
5. $dG = VdF - SdT$.

Функции H , E , G , ω , q имеют размерность энергии и чаще всего выражаются в калориях. Функция S выражается в калориях, деленных на градусы; член TS — в единицах энергии.

Четыре функции (H , E , G , S) отличаются от ω и q коренным образом, поскольку они представляют собой функции состояния в том смысле, что их значения зависят только от состояния системы, т. е. изменение этих величин обусловлено лишь начальным и конечным состояниями системы, но не путем между ними. Что же касается величин ω и q , то они зависят от пути, и для их вычисления необходимо знать, по какому пути система переходит из одного состояния в другое. Однако если мы зададим путь, поддерживая систему при постоянном объеме или при постоянном давлении, так что она при этом не будет испытывать никакой другой работы, тогда q становится функцией состояния.

Поскольку величина функции состояния, например E , зависит только от состояния системы, мы всегда можем взять интеграл

$$\int_{E_1}^{E_2} dE$$

и получить $E_2 - E_1$. Вместе с тем dq и $d\omega$ нельзя проинтегрировать, чтобы получить q или ω , так как теплота и работа зависят от пути и dq и $d\omega$ — не полные дифференциалы. Однако их сумма, $dq + d\omega$, будет полным дифференциалом, равным dE . Эти положения можно сформулировать следующим эквивалентным образом:

1. E есть функция состояния системы.
2. dE есть полный дифференциал.
3. Интеграл dE по замкнутому пути (криволинейный интеграл) равен 0, т. е.

$$\oint dE = 0.$$

Если система проходит через ряд непрерывно изменяющихся состояний и в конце возвращается к первоначальному состоянию, общее количество энергии, внесенной в систему и выведенной из нее, равно нулю.

Важное и полезное выражение, применимое к полным дифференциалам, представляет собой соотношение обратимости Эйлера, которое утверждает: если полный дифференциал выражается в виде $dE = ydx + zd\omega$, то

$$\left(\frac{\partial y}{\partial \omega}\right)_x = \left(\frac{\partial z}{\partial x}\right)_\omega.$$

Это соотношение получается в результате того, что порядок дифференцирования в дифференциальном исчислении не имеет значения.

Мы будем использовать символ d для обозначения бесконечно малого изменения или приращения, а символ ω — для макроскопического изменения.

Величина E включает в себя потенциальную энергию, кинетическую энергию, тепловую энергию, а также любую другую

энергию, которой обладает система. Поскольку абсолютная энергия (или полная энергия) системы неизвестна, мы должны сфокусировать внимание на изменениях энергии при переходе системы из одного состояния (первый набор условий) в другое (второй набор условий). Таким образом, энергетический обмен между системой и окружающей ее средой будет характеризоваться разностью $E_2 - E_1$, или ΔE . Индексы 2 и 1 будут использоваться в дальнейшем для обозначения величин функций, соответствующих конечному и начальному состояниям системы. При любом изменении состояния системы все возможные изменения энергии можно объяснить за счет того, что а) система может поглощать или терять тепло и б) система может сама совершать работу или работа может совершаться над ней. Для системы и ее внешней среды, рассматриваемых как одно целое, в математических терминах первый закон можно записать так:

$$\int dE = 0.$$

Для изолированной системы любое изменение ее внутренней энергии можно описать уравнением

$$\Delta E = q + \omega, \quad (1.1)$$

которое читается так: «Увеличение внутренней энергии системы равно сумме тепла, переданного системе, и работы, совершаемой окружающей средой над системой». Это *первый закон термодинамики* — закон сохранения энергии.

Если система отдает внутреннюю энергию окружающей среде, то знак ΔE будет отрицательным. Согласно этому математическому выражению первого закона, если ω положительна, то это значит, что окружающая среда производит работу над системой; если же ω отрицательна, то это значит, что система производит работу над окружающей средой. Положительное значение q указывает на то, что тепло поглощается системой, а отрицательное значение q свидетельствует о том, что тепло уносится из системы во внешнюю среду.

Согласно другой интерпретации математического выражения первого закона, можно считать, что этот закон содержит определенные требования к балансу общего количества энергии разных видов, характерных для данной системы. Любое изменение энергии, приводящее к ее увеличению или потере, может быть описано простым уравнением, приведенным выше. Как уже говорилось, изменение энергии зависит только от начального и конечного состояний системы, тогда как q и ω зависят от пути, по которому происходит изменение в системе. Это фундаментальное различие между ΔE и q (или ω) хорошо проиллюстрировано в книге Клотца [5].

«...Представим себе тяжелый камень, лежащий на краю отвесной скалы. Этот камень можно перенести на дно долины различными способами. Один способ состоит в том, чтобы привязать один конец веревки к этому камню, а другой — к другому камню одинакового с ним веса, лежащему на дне долины; пропустив веревку через колесо блока, смонтированного на краю скалы, можно опускать верхний камень на землю, при этом второй камень будет подниматься на вершину скалы. При такой операции первый камень совершает положительную работу, причем тепло в этом процессе не выделяется и не поглощается. Другим способом камень можно просто скатить каким-то образом вниз в долину. При этом было бы получено меньше работы, но перемещение камня сопровождалось бы выделением определенного количества тепла. Другие выбранные нами способы отличались бы лишь величиной трения, которое испытывал бы камень при движении. Для каждого пути характерна своя проделанная работа (ω) и выделившееся тепло (q), отличающиеся от соответствующих величин для любого другого пути. Тем не менее, несмотря на большое число вариаций ω и q , разность $q - \omega$ во всех опытах должна оставаться одинаковой, так как начальные и конечные точки движения камня при любых способах одинаковы».

1.1. ТЕРМОХИМИЯ

В целом в биологии и в частности в фармакологии наибольшее применение первого закона термодинамики нашло свое отражение в термохимии.

Раздел термохимии, в котором специально рассматривают изменение энтальпии, сопровождающее химические реакции, называется термохимией. Уже давно были сформулированы два важных положения, которые представляют собой законы термохимии.

В 1780 г. Лавуазье и Лаплас установили, что количество теплоты, поглощаемое при разложении соединения, должно быть равно количеству теплоты, выделяющемуся при его образовании. Таким образом, при написании обратимых реакций нужно изменять знак ΔH . В 1840 г. Гесс показал, что суммарный тепловой эффект химической реакции при постоянном давлении не зависит от промежуточных стадий реакции. Оба принципа логически вытекают из первого закона термодинамики и являются следствием того факта, что энтальпия есть функция состояния. Это позволяет рассматривать изменения энтальпии для реакций, которые нельзя изучать непосредственно.

Весьма удобным и полезным понятием в термохимии является энтальпия (теплота) образования ($\Delta H_{\text{обр}}^0$). По определению — это тепло, поглощенное или выделенное в процессе синтеза 1 моля соединения из его элементов, при условии, что все компоненты системы находятся при этом в стандартных состояниях. Теплоту образования элемента в стандартном состоянии произвольно принимают за 0. Это объясняется тем, что абсолютные энтальпии веществ неизвестны, но, к счастью для термохимии, интерес представляют лишь разности энтальпий продуктов и исходных веществ. Таким образом, важно знать не абсолютное значение энтальпии вещества, а то, насколько она отличается от энтальпий других веществ. Поэтому можно произвольно утверждать, что энтальпия элемента равна нулю при любой температуре.

Стандартное состояние элемента есть его наиболее устойчивая форма при 25 °С и давлении 1 атм, что позволяет сочетать их в различных вариантах уравнения 1.2.

$$\Delta H_p = \Sigma \Delta H_{\text{обр. пр.}} - \Sigma \Delta H_{\text{обр. реаг.}} \quad (1.2)$$

где ΔH_p — теплота, поглощаемая или выделяемая при протекании реакции, $\Delta H_{\text{обр. пр.}}$ — теплота образования продуктов реакции, а $\Delta H_{\text{обр. реаг.}}$ — теплота образования реагирующих веществ.

В идеале это соотношение позволяет вычислить ΔH для любой химической реакции.

Другой тип теплового эффекта — изменение энтальпии при растворении одного вещества в другом. Это так называемая теплота растворения, которая зависит от концентрации полученного раствора. Различают интегральную и дифференциальную теплоту растворения. Первая определяется как изменение энтальпии при растворении одного моля вещества в n молях растворителя.

Когда растворяемое вещество и растворитель химически подобны и при растворении не возникает осложнений, связанных с ионизацией или сольватацией, теплоту растворения можно считать приблизительно равной теплоте плавления растворяемого вещества.

Дифференциальная теплота растворения — это теплота растворения 1 моля вещества в таком большом объеме раствора, что добавление еще одного моля растворяемого вещества не вызывает заметного изменения концентрации раствора. Дифференциальная теплота растворения зависит от концентрации раствора. Эту теплоту нецелесообразно измерять непосредственно, но ее можно рассчитать по интегральным теплотам растворения.

Энергии связей классифицируют как энергию разрыва связей (Д) и как саму энергию связей (ЭС). В первом случае это энергия, требуемая для разрыва некоторой связи с образованием нейтральных частиц (гомологичный разрыв). Эта величина

соответствует разности энтальпий между исходной молекулой и двумя образующимися фрагментами. Во втором случае — это характеристика прочности некоторой связи в молекуле. Существуют примеры (двухатомные молекулы) когда Δ и ЭС совпадают. Однако для многих реакций такая закономерность отсутствует.

Первый закон термодинамики помогает нам при расчетах энергетического баланса. В сущности он утверждает, что энергия может превращаться из одной формы в другую, но не может создаваться или уничтожаться. Этот закон, однако, ничего не говорит о том, будет ли происходить то или иное событие и в каком направлении могут идти изменения в системе. Для этой цели рассмотрение энергетического баланса само по себе недостаточно. Необходимо ввести еще несколько показателей, позволяющих прогнозировать возможность и направленность процессов: градиент, энтропия, свободная энергия.

Основное положение *второго закона термодинамики* сводится к тому, что: невозможно перевести тело от более холодной системы к более горячей при отсутствии одновременных изменений в обеих системах или в окружающей среде. Следствием этого положения является утверждение, что самопроизвольно могут протекать лишь процессы, связанные с переносом энергии от более высокого уровня к более низкому, т. е. по градиенту.

Градиент какого-либо параметра системы определяется как разность величин этого параметра в двух точках, отнесенная к расстоянию между ними. Математически, градиент — это вектор, т. е. функция, характеризующаяся не только величиной, но и направлением.

Когда сравнивается живая клетка с неживой системой, то первое отличие, которое бросается в глаза — это наличие в живой клетке многочисленных градиентов. В качестве примера можно привести осмотический градиент, присущий всем живым клеткам и играющий особенно значительную роль в жизнедеятельности растительных клеток (тургор); концентрационный градиент, обусловленный неравномерным распределением

различных веществ между клеткой и наружной средой. Далее, известно, например, что в большинстве клеток содержание ионов калия внутри клетки значительно превышает содержание ионов калия в омывающей среде, в то время как распределение ионов натрия подчиняется обратному соотношению. С неравномерным распределением ионов связано возникновение электрического градиента через мембрану клеток. Наличие градиентов открывает принципиальную возможность совершения работы в живой клетке. Например, генерация нервного импульса связана с реализацией неравномерного распределения ионов и электрического градиента. Набухание клеток связано с наличием осмотического градиента и т. д. Характерно, что в мертвых клетках вышеуказанные градиенты отсутствуют.

Энтропия S — функция состояния системы. Это значит, что, как и внутренняя энергия E , энтропия имеет конкретное системное значение, когда система находится в определенном состоянии. Дифференциал dS для бесконечно малого обратимого изменения выражается следующим образом:

$$dS = dq_{\text{обр.}}/T, \quad (1.3)$$

где T — температура, определяемая этим соотношением. Употребление dq вместо $dq_{\text{обр.}}$ напоминает нам, что q не является функцией состояния, а зависит от пути, по которому осуществляется изменение. Однако для обратимого процесса dq/T представляет полный дифференциал. Из уравнения 1.3 видно, что T является интегрирующим множителем для теплоты, так как $dq_{\text{обр.}}/T$ — полный дифференциал. Изменение энтропии, сопровождающее данное изменение состояния, не зависит от пути перехода. Изменение энтропии для конечного изменения от состояния 1 до состояния 2 получают интегрированием уравнения 1.3 по обратимому пути:

$$\Delta S = S_2 - S_1 = \int_1^2 \frac{dq}{T}. \quad (1.4)$$

Любой обратимый путь между состояниями 1 и 2 даст то же самое значение интеграла. Энтропия — экстенсивное свойство; подобно объему V и внутренней энергии S , она зависит от массы рассматриваемой системы.

Второй закон можно представить в удобной форме, используя понятие энтропии. Для любого бесконечно малого процесса дифференциал dS больше, чем dq/T , или равен этой величине:

$$dS = dq/T, \quad (1.5)$$

Этим второй закон устанавливает различия между двумя типами изменений: изменения, для которых дифференциал энтропии равен dq/T являются обратимыми, а те, для которых дифференциал энтропии больше dq/T — необратимыми. К обратимым изменениям относится, например, перенос бесконечно малого количества теплоты от резервуара с температурой T к резервуару, температура которого ниже на бесконечно малую величину.

На основе утверждения, что для необратимого процесса $dS > dq/T$, второй закон дает критерий, позволяющий судить о возможности протекания химической реакции. Только показав, что это неравенство применимо к данному изменению состояния или данной химической реакции, можно утверждать, что это изменение или эта реакция произойдет самопроизвольно.

Уравнение 1.5 удобно применять к изолированным системам, т. е. к системам с постоянной внутренней энергией S и постоянным объемом V , которые не обмениваются с окружающей средой ни теплотой, ни работой, ни веществом. Для изолированной системы $dq = 0$, и уравнения 1.3 и 1.5 приобретают следующий вид:

- для бесконечно малого обратимого изменения $dS = 0$, 1.6
- для бесконечно малого необратимого изменения $dS > 0$. 1.7

Для конечного обратимого изменения в изолированной системе $\Delta S = 0$, а для конечного необратимого изменения $\Delta S > 0$. Таким образом, когда в изолированной системе происходит

необратимое изменение, энтропия возрастает. Когда все возможности увеличения энтропии при самопроизвольных изменениях будут исчерпаны, энтропия будет иметь максимальное значение. Для любого бесконечно малого изменения состояния при равновесии в изолированной системе $dS = 0$.

1.2. КРИТЕРИИ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКОГО РАВНОВЕСИЯ

Необходимо отметить, что, согласно классической термодинамике, точное количественное выражение основных термодинамических величин (энтропии, свободной энергии, внутренней энергии, энтальпии и др.) можно получить только в случае обратимого процесса.

Исходя из второго закона термодинамики, полный переход тепловой энергии в работу не может произойти без соответствующей компенсации, которая обусловлена либо изменением состояния системы, либо изменением в окружающей среде. Можно назвать процесс перехода системы из одного состояния в другое обратимым, если обратный переход не связан с некомпенсированным превращением энергии в работу. Процесс перехода системы из одного состояния в другое называется необратимым, если обратный переход связан с необходимостью затраты излишка энергии извне. Это — термодинамический критерий обратимости. Этот критерий не совпадает с понятием обратимости и необратимости биохимических реакций. Биохимическую реакцию называют обратимой, если она может осуществляться как в прямом, так и в обратном направлении, несмотря на то, что возвращение реакционной смеси в исходное состояние сопряжено с некомпенсированными потерями энергии. Более того, в организме функционируют различные обратимые биохимические циклы, например, цикл трикарбоновых кислот, в котором возвращение продуктов реакций в исходное

состояние включает множество побочных реакций, в том числе и необратимые процессы — диффузию.

Такое различие в толковании обратимости связано с различиями в толковании термодинамического или устойчивого равновесия, поскольку для химических реакций понятие обратимости и равновесия совпадают. При равновесном процессе, т. е. процессе, идущем через ряд равновесных состояний, в каждый данный момент система находится в состоянии, бесконечно близком к равновесию, и достаточно незначительно изменить условия, чтобы процесс был обращен. Исходя из этого, можно полагать, что движение к равновесию химической реакции заключается в стремлении достигнуть равновесия и остановиться. Однако на самом деле равновесие химической реакции является динамическим. Оно устанавливается не вследствие отсутствия или прекращения процесса, а вследствие его протекания одновременно в двух противоположных направлениях с одинаковой скоростью. Это положение аксиоматируется в теории абсолютных скоростей реакции, которая предполагает, что все химические (биохимические) реакции обратимы и используют термодинамические параметры для описания кинетики биохимических процессов.

Таким образом, при использовании термодинамики для описания биохимических реакций необходимо учитывать, что биохимические процессы, как и многие другие, могут лишь в той или иной степени приближаться к равновесию и считаться обратимыми.

Открытая система не может находиться в состоянии термодинамического равновесия, поскольку последнее характеризуется полным отсутствием каких-либо процессов, что, очевидно, противоречит самому определению открытой системы.

Состояние называется стационарным, если с течением времени параметры системы не изменяются.

Открытая система обменивается с окружающей средой веществом и энергией, поэтому изменение энтропии в такой системе разделяют на две части. Обозначая через dS_e поток энтропии, обусловленный взаимодействием с окружающей средой, а через

dS_i часть энтропии, обусловленную изменениями внутри системы, можно представить общее изменение энтропии в системе как:

$$dS = dS_i + dS_e. \quad (1.8)$$

Превращение энтропии dS_i , обусловленное изменениями внутри системы, в силу второго закона термодинамики может иметь только положительное значение или равняться нулю. Величина dS_i равна нулю только тогда, когда система претерпевает обратимые изменения, но она всегда положительна, если в системе идут необратимые процессы. Таким образом: $dS_i = 0$ для обратимых процессов, $dS_i > 0$ для необратимых процессов.

Величина dS_e может принимать любые значения: положительные, отрицательные и нулевые. В изолированной системе обмена с окружающей средой нет и $dS_e = 0$, а $dS = dS_i$, т. е. приращение энтропии всей системы определяется приростом энтропии внутри системы. Наиболее интересен случай, когда величина $dS_e < 0$ и по абсолютной величине больше прироста энтропии в системе dS_i . При этом общее изменение энтропии в открытой системе становится отрицательным. Таким образом, теория открытых систем предполагает случай уменьшения энтропии в системе за счет взаимодействия с окружающей средой. При равенстве $dS_i = dS_e$ общее изменение энтропии равно нулю, что соответствует случаю стационарного состояния.

Как уже отмечалось, если в системе все параметры постоянны во времени и нет никаких стационарных потоков за счет действия каких-либо внешних источников, то состояние системы называется равновесным (состояние термодинамического равновесия). Основные черты сходства и различия стационарного равновесия и равновесия термодинамического заключены в трех параметрах. Это — энтропия, свободная энергия и время. Термодинамическое равновесие не зависит от времени, энтропия его максимальна, а свободная энергия равна нулю, т. е. система полностью деградирована и не в состоянии производить работу.

Сходство термодинамического равновесия со стационарным заключается в независимости от времени, т. е. подобно равновесной системе, стационарная система во времени сохраняет свои основные параметры неизменными. Энтропия стационарной системы имеет некую постоянную величину $dS = const$, не равную максимальной. Свободная энергия, или термодинамический потенциал, стационарной системы не равен нулю, а характеризуется некоторой постоянной величиной $dZ = const$. Это означает, что система не находится в деградированном состоянии, а будучи выведена из равновесия, способна производить работу, прежде чем достигнет термодинамического равновесия.

Принципиальное отличие термодинамического равновесия от стационарного заключается в появлении кинетического параметра.

Уравнение 1.8 можно написать в следующем виде:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{dS_i}{dt} + \frac{dS_e}{dt}. \quad (1.9)$$

Таким образом, в стационарном состоянии организма скорость создания энтропии внутри организма равна скорости обмена энтропии с окружающей средой. В стационарном состоянии скорость приращения энтропии внутри системы, равная

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{dS_e}{dt},$$

отлична от нуля и становится одной из важнейших величин, характеризующих наряду с энтропией и свободной энергией открытую систему. Отличие dS_i/dt от нуля означает также неравенство потоков вещества в прямом и обратном направлении. Описывая обратимые химические реакции, мы подчеркивали, что термодинамическое равновесие определяется равенством прямой и обратной реакции и в этом случае $(dS_i/dt) = 0$. В стационарном состоянии:

$$\frac{dS_i}{dt} = -\frac{dS_e}{dt} \neq 0.$$

Стационарному равновесию соответствует уравнение:

$$\frac{dS_i}{dt} = -\frac{dS_e}{dt}. \quad (1.10)$$

Таким образом, в стационарном состоянии скорость прямой реакции может превышать скорость обратной реакции, но разность скоростей должна поддерживаться постоянной во времени.

РАСТВОРЫ ЭЛЕКТРОЛИТОВ

Система LADMER представлена множеством разнообразных реакций: высвобождение активного начала из лекарственных форм, растворение, взаимодействие, соединения с макромолекулами (биологическими мишенями действия лекарственных средств), участие в химических и биологических превращениях, (субстраты ферментов, индукторы и ингибиторы) и др.

Скорость таких реакций зависит от различных факторов (природы реагирующих веществ, температуры, давления, катализаторов). Однако универсальной, объясняющей многие механизмы реакций, является зависимость их скорости от концентрации реагирующих веществ. Эта зависимость, получившая впоследствии название *закона действующих масс*, была сформулирована Гульдбергом и Вааге (1867) следующим образом: скорость химических реакций прямо пропорциональна действующим массам, т. е. концентрациям реагирующих веществ [2—4, 6].

Скорость реакции не остается постоянной, а изменяется во времени по мере взаимодействия исходных веществ.

Истинную скорость (v) реакции в данный момент рассматривают как производную от концентрации по времени:

$$v = dC/dt. \quad (2.1)$$

Реакция протекает за счет активных молекул, обладающих избыточной энергией, что проявляется в повышенной скорости их движения, усиленных колебаниях атомов в молекуле или в повышенных электронных уровнях энергии (возбужденное состояние). Переход исходной молекулы в активную называют активацией. Энергия, необходимая для активации, называется

энергией активации. Она равна разности между средней энергией активизированных частиц и средней энергией исходных молекул при температуре реакции.

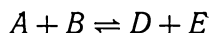
Скорость химической реакции возрастает с увеличением температуры. Это объясняется тем, что число активных молекул с повышением температуры увеличивается.

Логарифм константы скорости реакции ($\lg K$) находится в линейной зависимости от обратного значения абсолютной температуры ($1/T$).

При химическом взаимодействии система должна перейти от исходного состояния до активированного состояния через энергетический барьер.

Энергия активации реакций, протекающих между ионами, которые взаимодействуют практически при каждом столкновении, сопровождающемся перераспределением электронной плотности и возникновением новых химических связей очень мала или практически равна нулю.

В случае обратимой реакции



скорость прямой реакции v_1 взаимодействия вещества A с веществом B при постоянной температуре прямо пропорциональна концентрациям этих веществ.

$$v_1 = K_1 [A] [B], \quad (2.2)$$

где K_1 — коэффициент пропорциональности (константа скорости), зависящий от природы реагирующих веществ, температуры и давления; $[A]$ и $[B]$ — молярные концентрации веществ A и B .

Для обратного процесса скорость v_2 взаимодействия вещества D с веществом E равна:

$$v_2 = K_2 [D] [E], \quad (2.3)$$

где K_2 — коэффициент пропорциональности (константа скорости) для данного процесса; $[D]$ и $[E]$ — молярные концентрации веществ D и E .

По мере взаимодействия исходных веществ A и B их начальные концентрации уменьшаются; следовательно, постепенно уменьшается начальная скорость прямой реакции v_1 . По мере накопления продуктов реакции D и E концентрации их увеличиваются; следовательно, скорость обратной реакции v_2 постепенно увеличивается. Наконец, наступает такой момент, когда скорость прямой реакции v_1 становится равной скорости обратной реакции v_2 . При установившемся равенстве скоростей прямой и обратной реакций наступает химическое равновесие. Состояние химического равновесия характеризуется тем, что концентрация исходных и конечных продуктов реакции при данных температуре и давлении остается постоянной. Иными словами, при установлении равновесия в единицу времени образуется такое количество веществ D и E , какое в это же время распадается с образованием веществ A и B .

Таким образом, химическое равновесие является динамическим (подвижным): в момент равновесия химическое взаимодействие не прекращается, а продолжает идти с одинаковой скоростью в обоих направлениях — слева направо и справа налево.

В момент химического равновесия скорости прямой и обратной реакций равны ($v_1 = v_2$), поэтому

$$K_1 [A] [B] = K_2 [D] [E], \quad (2.4)$$

откуда

$$\frac{K_1}{K_2} = \frac{[D][E]}{[A][B]} = K. \quad (2.5)$$

Таким образом, отношение произведения концентраций конечных продуктов реакции к произведению концентраций исходных продуктов реакции достигает определенной величины, когда устанавливается химическое равновесие. Эту величину, постоянную для данной реакции при данной температуре, называют *константой равновесия реакции* (K).

Константа равновесия реакции представляет собой отношение констант скоростей прямой и обратной реакций

$$K = \frac{K_1}{K_2} \quad (2.6)$$

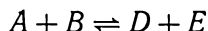
и меняется с изменением температуры и давления.

Константа равновесия реакции K определяет относительные количества компонентов, составляющих равновесную систему. Она показывает, что на состояние равновесия влияет каждое из участвующих в реакции веществ. Если изменить концентрацию одного из них, то равновесие нарушится. Чтобы величина K оставалась постоянной, должна измениться концентрация и другого компонента данной равновесной системы.

Всякое нарушение равновесия, при неизменных температуре и давлении, путем увеличения или уменьшения концентрации одного или нескольких реагирующих веществ немедленно приводит к новому состоянию равновесия.

Пользуясь константами равновесия реакций, можно теоретически предсказывать и математически рассчитывать направление разнообразных химических реакций, стремящихся к определенному состоянию химического равновесия.

Например, если константа равновесия реакции, выражаемой уравнением



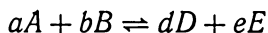
равна 10^{-6} , т. е. согласно закону действия масс

$$\frac{[D][E]}{[A][B]} = 10^{-6},$$

то это означает, что произведение равновесных концентраций продуктов реакции в 1 000 000 раз меньше произведения концентраций исходных продуктов реакции. Следовательно, равновесие смещено в левую сторону, т. е. указанная выше реакция протекает справа налево.

Если K равно 10^6 , то это означает, что произведение концентраций конечных продуктов реакции в 1 000 000 раз больше произведения концентраций исходных продуктов реакции. Следовательно, равновесие в этом случае будет сдвинуто в правую сторону, т. е. указанная выше реакция протекает слева направо.

Для реакции:



уравнение, выражающее константу равновесия, представляют следующим образом:

$$\frac{[D]^d[E]^e}{[A]^a[B]^b} = K, \quad (2.7)$$

т. е. коэффициенты молекулярных соотношений стехиометрического уравнения становятся показателями степени величин концентраций.

В общем виде закон действия масс в применении к обратимым реакциям можно сформулировать следующим образом: при установившемся химическом равновесии в обратимой реакции отношение произведения равновесных концентраций конечных продуктов этой реакции к произведению равновесных концентраций исходных продуктов реакции есть величина постоянная.

Если коэффициенты a , b , d , e не равны единице, то численные значения концентраций $[A]$, $[B]$, $[D]$ и $[E]$ должны быть возведены в соответствующие степени.

Уравнение 2.7, выражающее константу равновесия реакции, применимо только для идеальных растворов.

В большинстве случаев реальные растворы дают отклонения от законов для идеальных растворов, так же как это наблюдается и в отношении идеальных и реальных газов. Поэтому при использовании закона действия масс получаются лишь приближенные результаты, но для практических целей в ряде случаев такая точность достаточна.

При концентрациях реагирующих веществ, меньших и значительно превышающих одномолярные, результаты расчетов, получающиеся в случае применения закона действия масс, для слабых электролитов отклоняются на несколько процентов от действительных. Для сильных электролитов наблюдаются значительные отклонения даже при более низких концентрациях.

Закон действия масс в его классической форме применим только к неэлектролитам и слабым электролитам в разбавленных водных растворах. Все сильные электролиты (щелочи, сильные кислоты, соли) и слабые электролиты в концентрированных водных растворах не подчиняются закону действия масс.

2.1. РАВНОВЕСИЯ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ (В ГОМОГЕННЫХ СИСТЕМАХ)

Различают гомогенные и гетерогенные системы. Гомогенными называют такие системы, которые не имеют поверхности раздела между частями системы с различными свойствами, т. е. состоят из одной фазы (растворы солей, кислот, оснований).

Гетерогенными называют системы, состоящие из двух или нескольких фаз. Каждая фаза отделена от других поверхностями раздела (октанол — вода, в случае определения липофильности химических соединений).

Кислоты и основания образуют исключительно важный класс электролитов. Химические равновесия, в которых участвуют кислоты и основания, встречаются чаще всего. Для нормального функционирования ферментов, поддержания осмотического давления и т. п. необходима весьма тонкая регуляция кислотно-основных равновесий или рН в организме. Иногда отклонение рН от нормального значения всего на 0,01 единицы приводит к заболеванию или даже к гибели.

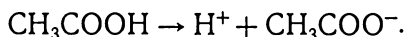
Для правильного понимания кислотно-основных равновесий в химических и биологических системах необходимо отчетливо

представлять себе свойства слабых кислот и слабых оснований, а также ионов водорода.

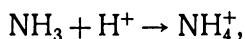
Согласно теории Бренстеда и Лоури (1923), кислоты — это вещества, способные служить донорами протонов, а основания — вещества, способные присоединять протоны. Таким образом, HCl — кислота, поскольку возможна реакция



HCl и Cl^- называются при этом *сопряженными* (или соединенными в пару) кислотой и основанием. Хлорид—ион называется основанием, поскольку он в принципе может присоединять протон. Для сильных кислот сопряженными являются слабые основания, а слабым кислотам соответствуют сильные сопряженные основания. Например:

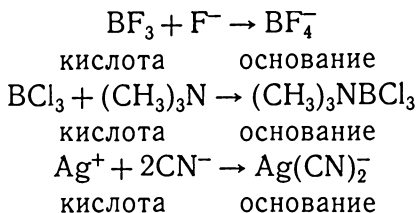


Аммиак — основание, поскольку он может присоединять протон:



а ион аммония является сопряженной кислотой. В то же время гидроокиси металлов, например NaOH или KOH , по терминологии Бренстеда и Лоури не являются сами по себе основаниями. Однако для всех практических приложений их можно считать полностью диссоциированными на ионы металла и ионы OH^- . Гидроксильные ионы, естественно, относятся к основаниям.

Более общее определение кислот и оснований было дано Льюисом в 1923 г. По Льюису, кислотой называется всякое соединение, способное присоединять электроны, а основанием — всякое соединение, способное отдавать электроны. Такое определение не только охватывает все примеры, приведенные ранее, но и включает кислотно-основные реакции, протекающие без участия протонов. Вот несколько примеров:



Определение Льюиса применимо к значительно более широкому ряду соединений и с теоретической точки зрения представляется более фундаментальным.

2.1.1. СТРОЕНИЕ ВОДЫ И ЕЕ СВОЙСТВА

Вода является растворителем и обладает уникальными свойствами, определяющими ее идеальную пригодность для той биологической роли, которую она выполняет. Все процессы в системе LADMER осуществляются в водной среде, поэтому структура воды в жидком состоянии является для нее определяющей.

Достойны упоминания и другие свойства воды, такие, как высокое поверхностное натяжение, низкая вязкость, относительно высокие температуры плавления и кипения и более высокая плотность в жидком состоянии, чем в твердом.

Эти важные свойства воды крайне существенны для биологических процессов, в то же время благодаря им создаются трудности при попытке количественного расчета термодинамических характеристик водных систем в жидком состоянии. Отсутствие удовлетворительного общего уравнения для жидкого состояния также осложняет ситуацию. Если для газов выведено несколько рабочих уравнений состояния (уравнение идеального газа, уравнение Ван-дер-Ваальса для реальных газов и т. д.), то для жидкостей аналогичных обобщений не существует [2, 3, 7, 8].

Первый толчок в нужном направлении был дан теоретиками, которые исходили из того, что молекулы жидкой воды не-

которым образом ассоциированы и, возможно, вода представляет собой полимерное соединение низкого молярного веса. Развитие этих идей привело к гипотезе о структуре, насыщенной водородными связями и богатой областями, содержащими упорядоченно уложенные цепи связанных друг с другом молекул воды и напоминающими структуру льда.

Структура льда при обычных давлениях — хорошая отправная точка, с которой можно начать рассмотрение жидкой воды. Молекулы воды во льду связаны друг с другом водородными связями и образуют тетраэдры. Кристаллическая решетка льда похожа на решетку тридимитной формы SiO_2 , для которой тоже характерно тетраэдрическое положение атомов.

Из шести внешних электронов атома кислорода воды лишь два образуют электронные пары с двумя атомами водорода. Ядро атома кислорода сильно притягивает остальные четыре электрона, так что атомы водорода оказываются электроположительными. Центры отрицательного заряда, т. е. области с наибольшей концентрацией электронов, располагаются в стороне от O—H связей. Точная геометрия этой системы такова, что если атом кислорода помещается в центре тетраэдра, а два атома водорода занимают две вершины этого тетраэдра, то центры отрицательного заряда смещены в направлении двух других вершин. Таким образом, вода это не только электрически полярная молекула, но и структура в которой два центра положительного и два центра отрицательного заряда образуют конфигурацию тетраэдра. В жидком состоянии молекулы воды оказывают друг на друга ориентирующее влияние за счет того, что центры отрицательного заряда притягивают центры положительного заряда, и наоборот. Каждая молекула воды притягивает четыре другие молекулы, которые стремятся расположиться вокруг нее так, чтобы образовать тетраэдр. В жидкой воде такая «тетраэдрическая» фаза находится в состоянии динамического равновесия: скопления ориентированной, «кристаллической» воды перемежаются с более случайно, хаотически распределенными молекулами.

При замерзании, однако, упорядочивается вся структура воды.

Спектральные методы анализа свидетельствуют о том, что жидкая вода находится в агрегатном состоянии, т. е. скопление молекул, объединенных водородными связями.

Для объяснения свойств жидкой воды предложено много моделей. Их строят с учетом различных степеней полимеризации, различной формы расположения водородных связей, «льдообразности» жидкой воды, а также проникновения свободных от водородных связей молекул воды в центры гексагональной упаковки молекул воды. Подводя итог усилиям, предпринимавшимся в течение десятков лет в этом направлении, можно сказать, что все эти модели обладали своими достоинствами и оказались в какой-то мере полезными. Состояние наших знаний о структуре воды суммировано в книге [2]. По мнению авторов, холодная вода построена в основном из структурных элементов, стабилизированных за счет водородных связей, с координационным числом четыре и отдельных молекул, заполняющих полости в промежутках между структурными элементами. Точная геометрия решетки неизвестна, однако имеются основания считать, что при низких температурах структура является регулярной, но по мере нагревания воды ее регулярность исчезает. На рис. 2.1 схематически изображена одна из моделей структуры воды, которая была предложена Фрэнком и Уэном [9]. Она позволила Немети и Шераге предсказать на основании количественного статистического

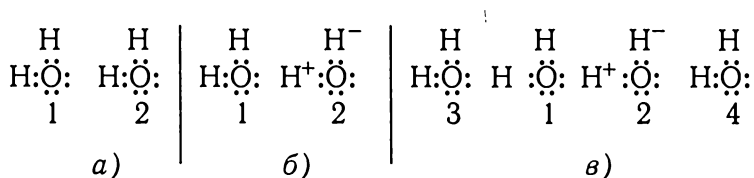
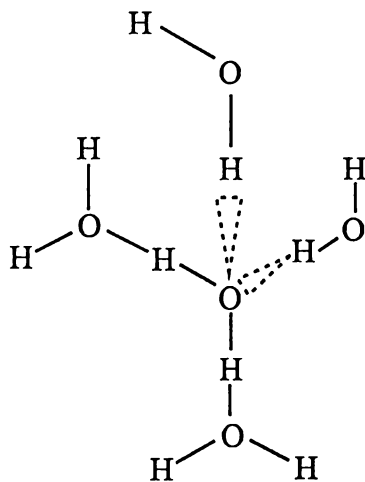


Рис. 2.1. Резонанс между молекулами воды, соединенными водородными связями, обуславливающий кооперативный характер взаимодействия в процессе образования водородных связей

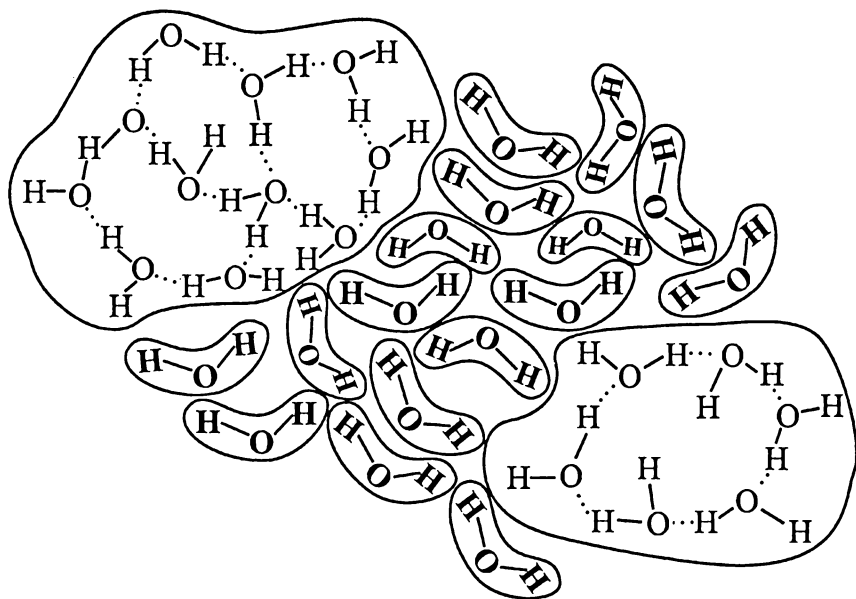
анализа многие из экспериментально установленных свойств воды. По предположению Фрэнка (рис. 2.1), водородные связи между молекулами воды (а) приводят к частичному разделению зарядов (б), что позволяет молекулам 1 и 2 легче образовывать дополнительные водородные связи с соседними молекулами (в). Таким образом, в соответствии с этой моделью в воде непрерывно происходят процессы образования и разрыва связей, причем эти процессы протекают кооперативно в пределах короткоживущих групп молекул воды, которые Фрэнк и Уэн образно называли «мерцающими кластерами» («flickering clusters»). Представление о воде как об ансамбле «мерцающих кластеров», постулируемое моделью Фрэнка и Уэна, позволяет понять высокую степень подвижности структуры жидкой воды и ее низкую вязкость (рис. 2.2).

Помимо водородных связей, за счет которых образуется псевдоледяная структура кластеров молекул воды, следует помнить о диполь-дипольных и лондоновских взаимодействиях между несвязанными молекулами воды, заполняющими пространство между кластерами. На основании ряда результатов, полученных физическими методами, в настоящее время считают, что «мерцающие кластеры» имеют среднее время жизни от 10^{-10} до 10^{-11} с. Их динамическое состояние является результатом локальных флуктуаций энергии в жидкости. В целом система стремится к состоянию равновесия, в котором свободная энергия будет минимальна. Молекулы воды должны образовывать столько водородных связей, сколько возможно без чрезмерного отклонения от угла тетраэдра $109^{\circ}28'$. Димеры и другие малые агрегаты, так же как протяженные или ограниченные цепи, считаются энергетически невыгодными. В соответствии с последней моделью Фрэнка для воды характерно наличие группы молекул, соединенных водородными связями, с включенными в них промежуточными мономерами.

Опираясь на результаты термодинамического анализа структуры воды, соответствующие модели были использованы для изучения водных растворов углеводов.



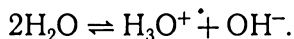
a)



б)

Рис. 2.2. Структура воды: а) — кристаллическая; б) — два «мерцающих кластера», пространство между которыми заполнено несвязанными молекулами воды

Чистая жидкая вода не состоит просто из молекул H_2O , а содержит также и ионы гидроксония в концентрации примерно $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л (при 25°C) и ионы гидроксила в той же концентрации. Эти ионы образуются в результате аутопротолиза воды. Реакция, при которой одна молекула воды в качестве кислоты взаимодействует с другой молекулой воды, выступающей в качестве основания называется реакцией диссоциации или ионизации воды:



Молекула, подобная молекуле воды, способная как терять протон, так и присоединять его, называется амфипротонной.

Несмотря на то, что в воде присутствует ион гидроксония H_3O^+ , который и определяет кислотные свойства водных растворов, обычно принято употреблять символ H^+ вместо H_3O^+ и говорить об ионе водорода, а не об ионе гидроксония.

Обычно вместо того, чтобы сказать, что концентрация ионов водорода в чистой воде равна $1 \cdot 10^{-7}$ М, говорят, что «рН чистой воды равен 7». Символ рН представляет собой десятичный логарифм ионов водорода:

$$\text{pH} = -\lg [\text{H}^+],$$

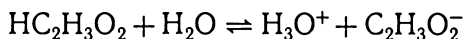
$$[\text{H}^+] = 10^{-\text{pH}} = \text{anti log} (-\text{pH}).$$

Из такого определения рН следует, что раствор, содержащий 1 моль ионов водорода в одном литре, т. е. имеющий концентрацию 10^{-0} по H^+ имеет рН, равный 0. Раствор, сила которого по ионам водорода в десять раз меньше, содержит 0,1 моля ионов водорода в 1 л имеет $[\text{H}] = 10^{-1}$, а, следовательно, рН такого раствора равен 1.

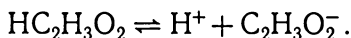
2.1.2. ДИССОЦИАЦИЯ СЛАБЫХ ЭЛЕКТРОЛИТОВ

Большинство лекарственных веществ — это слабые электролиты (слабые органические кислоты или основания). Будучи сама способной к диссоциации, вода, кроме того, усиливает диссоциацию слабых электролитов, которые в чистом виде пребывают в недиссоциированном виде и лишь по мере разбавления водой их диссоциация усиливается.

Например, уксусная кислота — слабая кислота; молекулы уксусной кислоты удерживают входящие в их состав молекулы настолько прочно, что не все из них переходят к молекулам воды и образуют ионы гидроксония. В данном случае устанавливается равновесие



или, если не учитывать гидратацию протона,



Выражение для константы равновесия этой реакции можно записать в следующем виде:

$$\frac{[\text{H}^+] + [\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-]}{[\text{HC}_2\text{H}_3\text{O}_2]} = K.$$

В общем виде для кислоты НА в равновесии с ионами H^+ и A^- константа равновесия выражается как

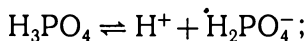
$$\frac{[\text{H}^+] + [\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = K_a.$$

Константа K_a , характерная для данной кислоты, называется ее кислотной константой или константой диссоциации.

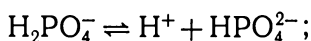
Эта величина, как правило, много меньше единицы (даже для CH_3COOH $K_a = 1,76 \cdot 10^{-5} = 10^{-4.7}$). Для большего удобства

вводят понятие величины $pK_a = -\lg K_a$. Чем меньше pK_a , тем больше кислотность соединения по Бренстеду. Так, у метана $pK_a = 40$, у метанола — 16, у воды — 14, у фенола — 9,8, у уксусной кислоты — 4,7, у соляной кислоты меньше 1.

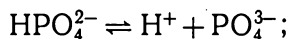
Многоосновная кислота имеет несколько констант диссоциации, соответствующих последовательному отщеплению ионов водорода. Для фосфорной кислоты H_3PO_4 можно записать три уравнения равновесия:



$$K_1 = \frac{[H^+] + [H_2PO_4^-]}{[H_3PO_4]} = 7,5 \cdot 10^{-3} = K_{H_3PO_4};$$



$$K_2 = \frac{[H^+][HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} = 6,2 \cdot 10^{-8} = K_{H_2PO_4^-};$$



$$K_3 = \frac{[H^+] + [PO_4^{3-}]}{[HPO_4^{2-}]} = 10^{-12} = K_{HPO_4^{2-}}.$$

Следует обратить внимание на то, что константы имеют размерность концентрации (моль·л⁻¹).

Отношение констант последовательной диссоциации для многоосновной кислоты обычно порядка 10^{-5} , как и в рассмотренном примере. Из приведенных данных видно, что по первому атому водорода фосфорная кислота является кислотой средней силы — значительно сильнее уксусной кислоты. По второму атому водорода она является слабой кислотой, а по третьему — очень слабой.

Слабое основание диссоциирует с образованием ионов гидроксила лишь частично



Соответствующее выражение для константы равновесия имеет вид

$$\frac{[\text{M}^+] + [\text{OH}^-]}{[\text{MOH}]} = K_b.$$

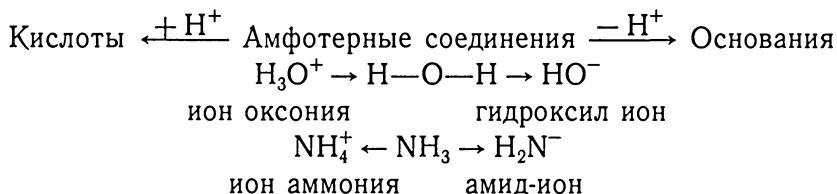
Константа K_b называется константой основности или константой диссоциации основания.

Чем больше pK_b сопряженной кислоты, тем больше основность соединения. Для оценки основности иногда используют и величину pK_b :

$$pK_b = pK_{\text{нон}} - pK_a,$$

где $pK_{\text{нон}} = 14$. Тогда, если pK_a уксусной кислоты равно 4,7, то pK_b — основность сопряженного основания (ацетат-иона) равна $14 - 4,7 = 9,3$.

Многие соединения с этих позиции являются амфотерными:



В заключении добавим, что в органической химии кислотой принято называть вещество, диссоциирующее с образованием протона (H^+), а основанием — вещество, связывающее протон в малодиссоциирующую молекулу.

Кислотно-основные характеристики определяют не только свойства лекарственных средств, но и биологическую мишень их действия, например белки.

Тот факт, что белки являются многовалентными кислотами и основаниями, определяет важное свойство их структуры. Значения pK кислотных групп в белках приведены в табл. 2.1. Значение pK данной группы в белке меняется в широком диапазоне из-за влияния соседних частей белка, а также из-за электростатического действия зарядов на остаток молекулы белка. Если суммарный заряд молекулы белка положителен, как это имеет место в ряде кислотных растворов, то протону легче выйти из кислотной группы, и значения pK понижаются. Если же суммарный заряд отрицателен, как в случае некоторых щелочных растворов, то протону труднее выйти из кислотной группы, и значения pK повышаются. Вследствие этого кривая титрования белка может быть более крутой, чем кривые титрования аминокислотных цепей. На каждом конце полипептидной цепи будет находиться α -карбоксильная или α -аминогруппа. Добавочные электрические заряды — это результат связывания ионов белком. В изоэлектрической точке число положительных зарядов равно числу отрицательных зарядов, так что в приложенном электрическом поле белок не движется.

Кислотные и основные группы белка концентрируются на внешней стороне белка. Они являются гидрофильными группами в отличие от гидрофобных групп, например алифатических цепей, и склонны увеличивать растворимость белка.

Таблица 2.1

Значения pK кислотных групп в белках (25 °C)

α -CO ₂ H	3,0—3,6
—CO ₂ H в аспарагиновой и глутаминовой кислотах	3,0—4,7
Имидазол в гистидине	5,6—7,0
α -NH ₂	7,5—8,4
—SH в цистеине	9,1—10,8
α -NH ₂ в лизине	9,4—10,6
Фенольный гидроксил в тирозине	9,8—10,4
Гуанидин в аргинине	12,0—13,0

При предельных значениях pH молекула белка начинает разматываться и, как говорят, теряет свои естественные свойства. Этот процесс может быть либо обратимым, либо необратимым в зависимости от природы белка и его обработки. Денатурация (потеря естественных свойств) часто необратима, так как она сопровождается значительным уменьшением растворимости, и белок осаждается из раствора. Белки можно также денатурировать нагреванием, даже при нейтральных pH, либо добавлением мочевины $(\text{H}_2\text{N})_2\text{CO}$ или других веществ, которые ослабляют связи, удерживающие белок в глобулярной форме.

2.1.3. РАСТВОРИМОСТЬ ЛЕКАРСТВ

Одно из наиболее удивительных свойств воды — ее способность растворять многие вещества с образованием водных растворов. Растворы — очень важное состояние вещества; они имеют весьма большое значение как для жизненных процессов, так и для их регуляции с помощью лекарственных средств.

Растворимость веществ сильно меняется в разных растворителях. Тем не менее установлено несколько общих правил, относящихся к растворимости, которые применимы главным образом к органическим соединениям [2, 3, 8, 10].

Одно из этих правил гласит, что *вещество имеет тенденцию растворяться в таких растворителях, которые химически подобны ему*. Так, углеводород нафталин C_{10}H_8 обладает высокой растворимостью в бензине, представляющем собой смесь углеводородов, несколько меньшей растворимостью — в этиловом спирте $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, молекулы которого состоят из коротких углеводородных цепей с гидроксильными группами, и очень плохой растворимостью — в воде, которая сильно отличается от углеводородов. В то же время борная кислота $\text{B}(\text{OH})_3$, являющаяся гидроокисью, обладает умеренной растворимостью в воде и в спирте, т. е. в веществах, которые

содержат гидроксильные группы, и нерастворима в бензине. Три указанных растворителя сами подтверждают то же правило: как бензин, так и вода смешиваются со спиртом (растворяются в нем), в то время как бензин и вода взаимно растворяются лишь в очень небольших количествах.

Этим фактам можно дать следующее объяснение: углеводородные группы (состоящие только из атомов углерода и водорода) взаимно притягиваются очень слабо, о чем свидетельствуют более низкие температуры плавления и кипения углеводородов по сравнению с другими веществами приблизительно такой же молекулярной массы. В то же время между гидроксильными группами и молекулами воды существует очень сильное межмолекулярное притяжение; температуры плавления и кипения воды лежат выше соответствующих температур любого другого вещества с небольшой молекулярной массой. Такое сильное притяжение обусловлено частично ионным характером связей $O-H$, благодаря чему на атомы накладывается электрический заряд. Положительно заряженные атомы водорода притягиваются затем к отрицательно заряженным атомам кислорода других молекул, образуя водородные связи и прочно удерживая молекулы вместе.

Термин *гидрофильный* часто применяют по отношению к веществам или группам, притягивающим воду, а термин *гидрофобный* применяют по отношению к веществам или группам, отталкивающим воду и притягивающим углеводороды. В действительности молекулы гидрофобного вещества воздействуют силами электронного вандерваальсова притяжения как на молекулы воды, так и на молекулы углеводородов. Растворимость паров воды, например, в керосине (смеси углеводородов) при $25^{\circ}C$ и давлении 0,313 атм (т. е. при давлении насыщенного пара над жидкой водой при этой температуре) составляет 72 мг в 1 кг растворителя, в то время как растворимость метана при том же парциальном давлении несколько меньше — 10 мг в 1 кг керосина. Молекулы воды притягиваются молекулами керосина несколько сильнее, нежели молекулы метана. Различие

между водой и метаном заключается в том, что при более высоких парциальных давлениях пары воды конденсируются в жидкость, которая стабилизируется межмолекулярными водородными связями, тогда как метан продолжает оставаться газом.

Растворимость метана в полярных растворителях почти та же, что и в неполярных; в спиртах от метанола CH_3OH до пентанола (амилового спирта) $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{OH}$ растворимость метана составляет 72—80 % значения для керосина. Силы вандерваальсова притяжения молекул растворителя в отношении молекул метана остаются почти одинаковыми для разных растворителей. С другой стороны, растворимость водяных паров при давлении 0,313 атм в амиловом спирте в 1400 раз больше, чем в керосине, и вода смешивается в любых соотношениях с легкими спиртами.

Вещества, состоящие из небольших неполярных молекул, например кислород, азот и метан, растворяются в воде примерно в 10 раз хуже, чем в неполярных растворителях. Вещества, состоящие из более крупных неполярных молекул, по существу не растворяются в воде, но, как правило, хорошо растворяются в неполярных растворителях. Вода как бы противодействует включению этих молекул, поскольку образование необходимых для этого пустот сопряжено с разрывом или деформацией водородных связей между молекулами воды. Соединения, подобные бензину и нафталину, не растворяются в воде, поскольку их молекулы в растворе мешали бы молекулам воды образовывать столь же большое число прочных водородных связей, как в чистой воде; с другой стороны, борная кислота растворима в воде потому, что уменьшение числа связей между молекулами воды компенсируется образованием прочных водородных связей между молекулами воды и гидроксильными группами молекул борной кислоты.

Углеводороды известны своей нерастворимостью в воде; однако если у них появляется такой заместитель, как гидроксильная группа ($-\text{OH}$), и образуется спирт, то растворимость повышается. Это объясняется тем, что протоны гидроксиль-

ных групп образуют водородные связи с атомами кислорода воды.

Следовательно, большинство органических соединений можно сделать водорастворимыми путем введения в углеродный скелет различных функциональных групп. Это могут быть: 1) неполярные группы, которые под влиянием сильно полярных молекул воды становятся диполями (индуцированный диполь); 2) полярные группы; 3) полярные группы, диссоциировавшие под действием водного растворителя.

В целом, функциональные группы в порядке возрастания полярности, а следовательно и растворимости в воде, можно расположить следующим образом: алкил, метильная группа, простой эфир, [кетон, альдегидная группа, сложный эфир, амид], спирт, [карбоксильная группа, аминогруппа], оргонофосфорная группа, цвITTERион (аминокислота). Чем больше таких групп содержит углеродный скелет, тем выше растворимость данного соединения.

Поскольку вода хороший диэлектрик, она служит превосходным растворителем для солей. Объясняется это тем, что ее высокая диэлектрическая проницаемость (примерно 81 при комнатной температуре) способствует молекулам соединяться с ионами с образованием гидратированных ионов.

Оба эти свойства обусловлены большим электрическим дипольным моментом молекулы воды.

Сила притяжения или отталкивания электрических зарядов обратно пропорциональна диэлектрической проницаемости среды, окружающей данные заряды. Это значит, что два противоположных электрических заряда взаимно притягиваются в воде с силой, равной $1/81$ силы их взаимного притяжения в воздухе (или в вакууме). Ясно, что если кристалл хлорида натрия находится в воде, то образующие его ионы отделяются от кристалла значительно легче, чем если бы кристалл находился на воздухе, поскольку электростатическая сила, притягивающая ион обратно к поверхности кристалла из водного раствора, составляет лишь $1/81$ силы притяжения данного иона из воздуха.

Поэтому не удивительно, что при комнатной температуре тепловое движение не может вызвать переход ионов из кристалла в воздух, но в то же время теплового движения ионов вполне достаточно для преодоления относительно слабого притяжения, когда кристалл окружен водой, что и приводит к переходу большого числа ионов в водный раствор.

В фармакологических исследованиях очень часто приходится встречаться не только с однофазными но и двухфазными жидкими смесями. Когда к последним добавляют какое-либо вещество, в общем случае оно распределяется между фазами с неодинаковыми равновесными концентрациями в каждой фазе [3, 8, 11].

Если водный раствор йода взболтать с хлороформом, то большая часть йода перейдет в хлороформ. Отношение концентрации йода в этих двух фазах, называемое *коэффициентом распределения*, остается постоянным в области малых концентраций растворенного вещества в каждой фазе. Для йода в хлороформе и в воде при комнатной температуре этот коэффициент равен 250; отсюда следует, что при взбалтывании раствора йода в хлороформе с водой или раствора йода в воде с хлороформом при достижении равновесия концентрация йода в фазе хлороформа будет в 250 раз превышать концентрацию йода в водной фазе.

Из рассмотрения различных равновесий следует, что коэффициент распределения растворенного вещества между двумя растворителями равен отношению растворимостей данного вещества в двух растворителях, если растворимости невелики.

Интерес к закономерностям распределения растворенного вещества между двумя фазами в биологии стал весьма значительным благодаря работам Овертона в 1898—1899 гг. В этот отрезок времени он изучал проницаемость различных растительных клеток по отношению ко многим веществам. Он заметил, что скорость проникновения того или иного вещества в клетку зависит от его растворимости в липидах. Эту растворимость Овертон находил, измеряя коэффициент распределения

вещества между оливковым маслом и водой, т. е. определяя после встряхивания вещества в смеси масла с водой его концентрацию в обеих фазах:

$$\text{Коэффициент распределения} = \frac{\text{Концентрация в масле}}{\text{Концентрация в воде}}$$

Исходя из корреляции между скоростью проникновения в клетку и растворимостью в липидах, Овертон заключил, что мембрана клетки состоит из тонкого слоя липидов. Хотя это обобщение подверглось в последующие годы значительной модификации, главный вывод Овертона — о том, что клетка окружена тонкой мембраной, состоящей по преимуществу из липидов, — сохранился неизменным.

Работы последователей Овертона подтвердили полученные им результаты, однако при этом обнаружилось, что правило относительно растворимости в липидах неприменимо к весьма малым молекулам, таким как вода, метанол, формамид и т. д. Эти малые молекулы проникают в клетку гораздо быстрее, чем можно было бы объяснить, исходя из их растворимости в липидах. Цитофизиологи сделали из этого вывод, что постулированная Овертоном липидная мембрана пронизана мелкими порами, заполненными водой и обеспечивающими быстрое проникновение в клетку малых полярных молекул (воды, метанола и т. п.).

Согласно сформулированным Овертоном эмпирическим правилам, проницаемость клеток для органических молекул уменьшается по мере возрастания количества гидроксильных, карбоксильных и аминок групп. Напротив, введение в молекулу метильных, этильных и фенильных групп облегчает ее проникновение, хотя длина углеводородного скелета, а, следовательно, размеры молекулы при этом возрастают.

Позже, исходя из современной теории электрического строения молекул, правилам Овертона было дано рациональное объяснение. В этой связи, все химические соединения, а также отдельные, входящие в их состав группы подразделяются на:

1) электрически симметричные, т. е. те, у которых центры положительных и отрицательных зарядов совпадают друг с другом. Такие соединения носят название неполярных, или гомеополярных (содержащие этильные, метильные и фенильные группы);

2) электрически несимметричные — центры положительных и отрицательных зарядов не совпадают (неполярные или гетерополярные). К ним относятся соединения с карбоксильными, гидроксильными и аминогруппами.

Неполярные вещества хорошо растворимы в липидах, хлороформе, гексане и имеют низкую диэлектрическую постоянную, а полярные хорошо растворимы в воде и характеризуются высокой диэлектрической постоянной.

Количественное выражение коэффициента распределения (P) осуществляется в логарифмической шкале ($\log P$) и называется *липофильностью вещества*. Для ее определения в качестве одной фазы используют воду или соответствующие буферы, а для другой — органические растворители (масло, хлороформ, ацетон и др.).

В экспериментальной работе среди неполярных и малополярных растворителей распространение получил n -октанол. Это обусловлено тем, что он, благодаря своей структуре, в наибольшей степени имитирует липидный слой биомембран. Сюда относится насыщаемость его алкильной цепи, наличие гидроксильной группы, которая в зависимости от ситуации может быть донором или акцептором протонов, образующих водородные связи. Более того, октанол частично растворяется в водной среде [12].

Если необходимо определить влияние pH на $\log P$, т. е. установить соответствие концентраций лекарственного вещества в обеих фазах, как в ионизированной, так и в неионизированной формах, используют D [13].

ПРИНЦИПЫ КОМПЛЕМЕНТАРНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ ЛЕКАРСТВ БИОЛОГИЧЕСКИМИ МАКРОМОЛЕКУЛАМИ

В предыдущей главе нами рассмотрены основные положения закона действия масс и его применение к процессам электролитической диссоциации, определяющей кислотно-основные свойства лекарственных средств, а также их растворимость.

Закон действия масс имеет еще одно приложение, касающееся проблем физико-химической фармакологии. Это так называемые процессы связывания малых молекул с большими, которые лежат в основе взаимодействия лекарств с транспортными белками, рецепторами, ионными каналами, ферментами, а также белками клеток после биологической активации веществ и др. [2, 3, 14].

Поскольку межмолекулярные взаимодействия слабы, молекулы способны достаточно прочно связываться друг с другом, только если есть соответствие между их поверхностями, а во взаимодействии участвует большое количество атомов. Для образования прочного комплекса соответствие должно быть достаточно точным, т. е. поверхности молекул должны быть комплементарными. Так, если на поверхности одной молекулы имеется выступ (например, группа $-\text{CH}_3$), то на комплементарной ей поверхности другой молекулы должно быть углубление; напротив положительного заряда должен быть расположен отрицательный. Группа, способная отдавать протон, может образовать водородную связь только в том случае, если есть комплементарная группа, содержащая неподеленные электроны. Для образования гидрофобных связей неполярные

(гидрофобные) группы должны располагаться одна против другой. Один из наиболее важных принципов биохимии гласит: *две молекулы, поверхности которых комплементарны, стремятся взаимодействовать и соединяться друг с другом, тогда как молекулы, не содержащие комплементарных поверхностей, не взаимодействуют*. Уотсон назвал это принципом избирательной «слипаемости» молекул.

Следовательно, в процессе связывания малых молекул с большими особое значение приобретают структура и физико-химические свойства взаимодействующих веществ.

В рамках физико-химической фармакологии, в связи с обсуждаемой проблемой, наибольший интерес представляет информация о мембранных белках (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Классификация белков биомембран в зависимости от их функций

Функции	Мембранные белки
1. Катализаторы метаболизма лекарств	<i>Ферменты</i> : CYP450, UGT, NAT, FMO и др.
2. Транспорт	<i>Переносчики</i> : подвижные переносчики (ОСТ, ОАТ, NT и др.); <i>Каналы</i> : неподвижные мембранные поры и селективные фильтры; <i>Насосы</i> (механизм активного транспорта)
3. Подвижность	<i>Микротрубочки</i> ; <i>Микрофиламенты</i> ; <i>Реснички, микроворсинки</i>
4. Рецепция и передача информации	<i>Рецепторы</i> : ионные каналы; <i>Рецепторы</i> : сопряженные с G-белками; <i>Рецепторы</i> : с тирозинкиназной активностью

К первой группе относятся белки, обладающие ферментативной активностью и катализирующие химическое превращение лекарств (Глава 8). Во второй группе перечислены белки, осуществляющие транспорт веществ, молекул и ионов, не сопровождающийся химическими превращениями субстратов (раздел 6.3.2) сюда относятся не только белки мембран, но и например, сывороточный альбумин (раздел 6.3.3.5), способный связывать и освобождать лекарственные средства. Белки мембран, функция которых заключается в трансмембранном переносе молекул или ионов, разделены на две группы: переносчики и каналоформеры. И те, и другие создают проницаемость мембран путем перемещения вещества с одной поверхности мембран на другую, но переносчики при этом передвигаются в мембране вместе с переносимым веществом. В противоположность им каналоформеры представляют собой молекулярную структуру белковой природы, формирующую канал проницаемости для строго определенных веществ. О природе ворот ионных каналов существуют пока лишь предположения. Термин «ворота» предполагает наличие в мембране молекулярной структуры, управляющей проницаемостью канала. Насосами называют белки, способные транспортировать вещества или ионы против градиента концентраций и мембранного потенциала. Необходимая для этого энергия во многих случаях черпается за счет гидролиза АТФ, поэтому эти белки имеют название АТФаз.

К третьей группе относятся различные белковые системы, обеспечивающие подвижность внутриклеточных структур и отдельных клеток в целом. Микротрубочки и микрофиламенты содержат сократительные белки и способны осуществлять изменения в структуре мембран. Они представляют собой систему цитоскелета.

Функции рецепции и передачи информации осуществляют в мембранах большое количество белков и они во многих случаях являются мишенями действия лекарственных средств. Такое разнообразие функций, выполняемых белками биомембран

обусловлено их структурой. К характерной особенности следует отнести физико-химические свойства структурных элементов белков и их уровни организации.

Самые разнообразные белки построены из 20 аминокислот. Известно, что остатки кислых и основных аминокислот более гидрофильны по сравнению с нейтральными аминокислотами. Входя в состав водорастворимых белков, они обычно располагаются на поверхности белковой глобулы, так что полярные группы контактируют с водной фазой. В противоположность этому аланин, метионин, пролин, ароматические аминокислоты и аминокислоты с разветвленными цепями значительно более гидрофобны и в молекуле водорастворимых белков находятся внутри глобулы. Оксипролин, серосодержащие аминокислоты, глицин занимают промежуточное положение между двумя этими группами.

Оценку степени гидрофобности того или иного радикала в молекуле аминокислоты производят по разности свободных энергий растворения данной аминокислоты в воде и 6М этаноле. Так, величина разностей свободных энергий для аланина составляет примерно 798 Дж/моль, для лейцина — 1722 Дж/моль; фенилаланин за счет наличия ароматического кольца обладает высокой гидрофобностью и разность свободных энергий для него равна 2268 Дж/моль. Наиболее гидрофобен триптофан, разность свободных энергий для него составляет порядка 3444 Дж/моль.

Полипептидные цепи различных белков построены из отдельных аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями, которые возникают между COOH - и NH_2 -группами соседних аминокислот.

Молекулярная масса белков определяется числом аминокислотных остатков (средняя молекулярная масса порядка 115). Если учесть, что в состав белков биомембран входит 100—500 аминокислот, то молекулярная масса этих белков изменяется в пределах 10 000—50 000 дальтон. Белки различаются не только аминокислотным составом, но и порядком следования аминокислотных остатков друг за другом в полипептидной цепи,

т. е. так называемой *первичной структурой белка*. Первичная структура белка определяет его физико-химические свойства и функциональную активность.

Мембранные белки, в отличие от водорастворимых, располагаются либо на поверхности мембран, либо погружаются в толщу гидрофобного слоя. Возможен и такой вариант, когда белок как бы прошивает мембрану насквозь, так что часть молекулы белка находится в мембране, а часть — в водной фазе. Одной из особенностей взаимодействия с гидрофобными областями липидов, является повышенное содержание гидрофобных остатков аминокислот по сравнению с гидрофильными.

Регулярные структуры, возникающие в полипептидной цепи при образовании водородных связей между CO- и NH_2 -группами соседних аминокислот называются *вторичными структурами*.

Полипептидная цепь может иметь вторичную структуру типа α -спирали и типа β -структуры (так называемый складчатый листок). α -Спираль в белке удовлетворяет следующим требованиям: 1) пептидная связь C—N является планарной (так же как и двойная связь); 2) водородные связи образуются только между группами C=O и N—H . Если сравнить аминокислотный остаток с одной ступенькой, высота которой равна 0,15 нм, то один виток спирали содержит 3,6 таких ступенек.

В отличие от α -спирали, образованной единой полипептидной цепью, β -структура образуется водородными связями, возникающими между двумя полипептидными цепями или между несколькими участками одной полипептидной цепи, которые удалены друг от друга не более чем на 0,47 нм. Первая из них образована вытянутыми полипептидными цепями, расположенными на расстоянии 0,47 нм друг на друга, аминокислотные последовательности которых (от NH_2 — конца к COOH — концу) направлены в противоположные стороны. Вторая — с одинаково направленными полипептидными цепями. Расстояние между повторяющимися единицами в полипептидной цепи равно 0,33 нм.

Вторичная структура типа α -спирали и β -структуры, образующаяся благодаря существованию водородных связей, стабилизируется электростатическими взаимодействиями между остатками кислых и основных аминокислот. Вторичную структуру белков изучают с помощью спектральных методов — инфракрасной спектроскопии, дисперсии оптического вращения (ДОВ) и кругового дихроизма (КД). Широкое применение нашел также метод изотопного обмена, которым можно зарегистрировать скорость обмена на дейтерий атома водорода в молекуле белка, не связанных водородными связями, и таким образом судить о наличии в молекуле того или иного типа вторичной структуры.

В последние годы наше познание в области пространственной структуры белков значительно расширилось. Накопление и систематизация обширного материала обеспечили качественный скачок в понимании принципов укладки полипептидной цепи в нативную конформацию. В конце 70-х гг. прошлого столетия широко бытовало представление, что все белки, структура которых была выяснена к тому времени, могут быть отнесены к одному из пяти структурных классов: класс I, включающий молекулы, построенные из α -спиралей; класс II — белки, целиком состоящие из β -складчатых структур; класс III, объединяющий белки, состоящие из сочетания α -спиральных и β -складчатых образований, следующих друг за другом; класс IV, включающий α/β белки, в которых α -спирали и β -складки чередуются в структуре молекулы; класс V, объединяющий небольшие белки с мало выраженной вторичной структурой.

В дальнейшем оказалось, что не все вновь описываемые белки могут быть отнесены к одному из этих типов пространственной организации, т. е. свойства макромолекулы (и в первую очередь ее функциональная активность) определяются специфическим характером укладки отдельных элементов вторичной и супервторичной структуры друг относительно друга. Недавно было установлено, что помимо α -спиралей, β -складок и β -изгибов, важной составной частью структуры являются так называемые

омега-петли, присутствие которых играет определяющую роль в конформационной подвижности многих белков.

Более 90 % аминокислотных остатков полипептидной цепи вовлечено в формирование этих четырех основных структурных единиц, составляющих первую ступень иерархической организации белковой молекулы. Вопрос о том, каким образом аминокислотная последовательность белка, определяет характер его пространственной структуры, остается однако, открытым. В настоящее время его можно отнести к числу наиболее актуальных и интенсивно разрабатываемых. Принципиальная важность этой проблемы объясняет обилие исследований, посвященных выяснению механизмов формирования отдельных элементов третичной структуры в процессе сворачивания полипептидной цепи [15].

Одно из наиболее существенных заключений, которое следовало из полученных результатов касается иерархического принципа сворачивания: вначале возникают элементы вторичной структуры, затем супервторичной; процесс завершается формированием глобулярных образований, называемых *доменами*. Окончательное формирование третичной структуры происходит благодаря специфическим взаимодействиям, возникающим между отдельными доменами, каждый из которых сворачивается самостоятельно. Длинные полипептидные цепи обычно формируют несколько доменов, величина которых варьирует, составляя в среднем 150 ± 50 аминокислотных остатков. Таким образом, домены можно рассматривать как компактные «субструктуры» в составе макромолекулы белка; являясь автономными «единицами сворачивания», они обладают минимальным отношением поверхность/объем и характеризуются тем, что число взаимодействий между функциональными группами аминокислот в составе домена значительно превышает таковое между соседними доменами.

Архитектурные принципы построения отдельных доменов как правило различны, что может быть связано с выполнением ими специфических функций, согласно общепринятому в настоящее время представлению, мультидоменные белки

возникли в процессе эволюции в результате слияния генов, кодирующих разные домены.

Сложившиеся представления об организации полипептидной цепи в отдельные домены обеспечило качественный скачок в развитии молекулярной биологии, так как позволило выяснить ряд общих закономерностей, определяющих механизмы функционирования переносчиков (раздел 6.3.3), ферментов (Глава 8), рецепторов (Глава 10). Стало очевидным, что основные свойства белков (табл. 3.1), обеспечивающие как их основные функции, так и регуляцию эффективности, в той или иной степени определяются их мультидоменной структурой.

Под *третичной структурой* белка понимают пространственное расположение полипептидной цепи, т. е. его конформацию. В формировании третичной структуры важную роль играют нековалентные взаимодействия между спиральными и β -структурными участками, образованными неполярными остатками аминокислот.

Если белок содержит не одну, а несколько субъединиц (полипептидных цепей), то их взаимное расположение в пространстве называется *четвертичной структурой* белка.

Третичная структура белка, характеризующаяся определенным расположением аминокислотных остатков в пространстве, определяет функциональную активность белка. Четвертичная структура белка важна в первую очередь как регуляторный фактор. Отдельные субъединицы белка, образующие его четвертичную структуру, называются *протомерами*, а сами белки, состоящие из нескольких протомеров, — *олигомерами*. Все белки, содержащие более чем одну субъединицу, являются *аллостерическими белками*, т. е. такими, функциональная активность которых регулируется при изменении конформации субъединиц в результате связывания с каким-либо реагентом (лигандом). Субъединицы в молекуле белка не всегда бывают идентичными: известно много случаев, когда одна субъединица обладает каталитической активностью, а другая выполняет регуляторную функцию, активируя или ингибируя каталитическую субъединицу.

3.1. СИЛЫ, ДЕЙСТВУЮЩИЕ МЕЖДУ МОЛЕКУЛАМИ

Характеризуя количественно межмолекулярные взаимодействия обычно оперируют следующими понятиями: вандерваальсовы силы, электростатическое взаимодействие, водородные связи и гидрофобные силы. Количественными характеристиками суммарного действия всех сил является константа равновесия и изменения энтальпии и энтропии рассматриваемой системы.

Прочность связи между двумя частицами можно охарактеризовать с помощью константы образования K_f .

Рассмотрим присоединение молекулы X к другой молекуле P , которая может представлять собой молекулы белка, нуклеиновой кислоты, ион металла или любую другую частицу. Если на поверхности P имеется лишь один центр связывания для X , то взаимодействие молекул описано уравнением 3.1, а константа равновесия K_f определяется уравнением 3.2:



$$K_f = [PX]/[P][X]. \quad (3.2)$$

Константа образования выражается обычно в л/моль (или M^{-1}); она является прямой мерой прочности связи — чем больше константа, тем сильнее взаимодействие. Прочность связи характеризуется также изменением стандартной свободной энергии $^*G^0$ реакции — чем более отрицательна $^*G^0$ реакции, тем прочнее связь.

$$\begin{aligned} \Delta G_f^0 &= -RT \lg K_f = -2,303RT \lg K_f = \\ &= -5,708 \lg K_f \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1} \text{ при } 25^\circ\text{C}. \end{aligned} \quad (3.3)$$

Чтобы избежать недоразумения, важно помнить, что наряду с константой образования (ассоциации) часто (особенно

в энзимологии и при определенной кислотности) используют константу диссоциации K_d :

$$K_d = 1/K_f. \quad (3.4)$$

К сожалению, в разных областях химии одинаково часто пользуются и константами образования (или ассоциации), и константами диссоциации; поэтому удобнее пользоваться не самими константами образования, а их логарифмами, поскольку они пропорциональны соответствующим изменениям свободной энергии:

$$\lg K_f = -\lg K_d = pK_d. \quad (3.5)$$

Логарифм константы образования равен pK_d и характеризует уменьшение стандартной свободной энергии в ходе реакции ассоциации. Заметим далее, что изменение стандартной свободной энергии ΔG^0 , соответствующее изменению pK_f и pK_d на единицу, составляет $-5,7$ кДж·моль $^{-1}$.

Средняя кинетическая энергия движения молекул в растворе равна приблизительно $3/2kT$, где k — константа Больцмана: для 1 моля при 25 °C эта величина составляет $3/2RT$, т. е. 3,7 кДж (0,89 ккал). Например, если $K_f = 10$ ($\Delta G^0 = -5,7$ кДж·моль $^{-1}$ или $-1,36$ ккал·моль $^{-1}$), то энергия связи лишь незначительно превышает энергию теплового движения молекул и образующийся комплекс непрочен. Если концентрации X и P в этом примере составляют 10^{-4} М (типичные значения концентраций для биологических систем), то это означает, что в виде комплекса будет находиться лишь 0,1 % всех молекул ($[\text{комплекс}] = K_f [X][P]$). Если константа образования в 1000 раз больше, т. е. $K_f = 10^{-4}$ ($\Delta G^0 = -22,8$ кДж·моль $^{-1}$), то в составе комплекса находится 38 % всех молекул, а при $K_f = 10^7$ (очень сильно взаимодействие ($\Delta G^0 = -40$ кДж·моль $^{-1}$, или $-9,55$ ккал·моль $^{-1}$), эта величина составляет 97 %).

Взаимодействие лекарств и белков осуществляется с помощью межмолекулярных сил, относящихся к категории слабых.

Эти взаимодействия получили групповое название вандерваальсовых, поскольку они были выведены из поправок Ван-дер-Ваальса к закону для идеального газа:

$$PV = nRT, \quad (3.6)$$

где P — давление, V — объем, T — абсолютная температура, n — число молекул и R — газовая постоянная, равная 1,987 кал/град/моль.

Уравнение Ван-дер-Ваальса имеет вид:

$$\left(P + \frac{a}{V^2} \right) (V - b) = nRT, \quad (3.7)$$

где a/V^2 — поправка, учитывающая препятствие между молекулами, а b — поправка, учитывающая их объем.

Межмолекулярные силы, обуславливающие отклонение от закона для идеального газа, отличаются друг от друга по величине. Кроме того, они по-разному изменяются с увеличением расстояния.

Как мы уже знаем из того, что говорилось о свойствах воды (2.1.1), молекула в целом электрически нейтральная, может быть полярной, т. е. «центр тяжести» ее положительного заряда может не совпадать с «центром тяжести» отрицательного заряда.

Такая молекула обладает *дипольным моментом*, который можно определить, измерив способность молекулы ориентироваться в электрическом поле. Чем больше разделение зарядов, т. е. полярность молекулы, тем выше ее дипольный момент.

Самые сильные из всех слабых взаимодействий — это взаимодействия типа *ион-диполь*, т. е. силы, действующие между ионом и полярной молекулой (например Na^+ и H_2O ; рис. 3.1, а). Часто именно эти силы, играющие вообще важную роль во многих биологических явлениях, обуславливают гидратацию ионов.

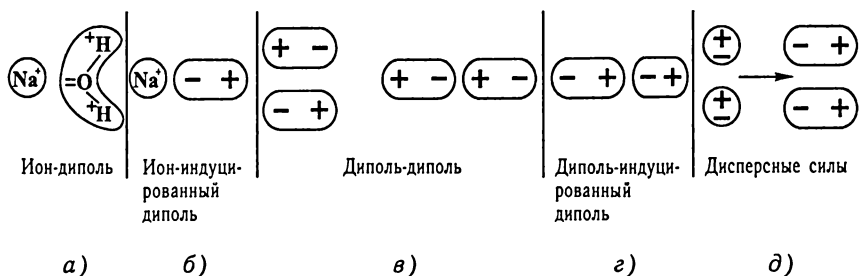


Рис. 3.1. Вандерваальсовы взаимодействия, обуславливающие слабое притяжение молекул

Взаимодействие *ион-индуцированный диполь* возникает как результат влияния иона на неполярную молекулу (рис. 3.1, б). При этом заряд иона индуцирует превращение неполярной молекулы в диполь, в результате чего возникает взаимодействие, несколько более слабое, чем ион-диполь.

Притяжение может существовать и между двумя диполями (рис. 3.1, в). Такое взаимодействие (*диполь-диполь*) обуславливает ориентацию молекул друг относительно друга и, возможно, играет важную роль в процессах сборки.

Диполь также может индуцировать превращение неполярных молекул в диполи. Взаимодействия *диполь-индуцированный диполь* относятся к числу слабейших (рис. 3.1, г).

Наконец, две неполярные молекулы могут притягиваться друг к другу вследствие того, что происходит взаимная индукция диполей. Хотя электроны в нейтральной молекуле распределены вокруг ядра равномерно, если рассматривать такую молекулу в течение длительного времени, однако в каждый данный момент существует значительная вероятность того, что центр отрицательного заряда не будет совпадать с центром положительного заряда. Отсюда и возможность существования мгновенных диполей, которые, пусть временно, но могут индуцировать превращение ближайших молекул в такие же диполи. Между диполями в такой системе возникает слабое притяжение. Это так называемые *дисперсионные силы*; именно

за счет этих сил такие газы как H_2 , N_2 или He , имеющие неполярные молекулы, могут при надлежащих значениях температуры и давления переходить в жидкое состояние (рис. 3.1, ∂).

Итак, важная особенность вандерваальсовых взаимодействий между органическими молекулами состоит в том, что все они обусловлены слабыми силами, действующими только на малых расстояниях; именно этим силам принадлежит, однако, выдающаяся роль в определении биологической структуры, биологической специфичности и характера биохимических реакций. Общий эффект складывается, естественно, из взаимодействий различных типов.

Изучая кристаллы различных органических молекул с помощью методов дифракции рентгеновских лучей и дифракции нейтронов, удалось показать, что расстояние между атомом водорода и электроотрицательным атомом меньше вандерваальсова радиуса электроотрицательного атома. Когда впервые с помощью рентгеноструктурного анализа, (который не дает возможности установить локализацию атома водорода), определили расстояние между двумя атомами кислорода, оказалось что оно лежит в пределах 2,75—2,45 Å. Это меньше вандерваальсова расстояния между двумя атомами кислорода (2,8 Å) и гораздо больше расстояния между двумя ковалентно связанными атомами кислорода (1,4 Å). Отклонения можно было объяснить допустив, что между двумя атомами кислорода помещается атом водорода. Так возник термин *водородная связь*.

Водородные связи — это слабые связи по сравнению с ковалентными, но довольно сильные в сравнении с вандерваальсовыми взаимодействиями. Энергия, нужная для того, чтобы разорвать ковалентную связь составляет 50—100 ккал/моль, тогда как для расщепления водородной связи требуется всего 0,5—12 ккал/моль.

Пожалуй, основная причина той огромной роли, которую играют в биохимии водородные связи, состоит в том, что они часто обеспечивают комплементарность поверхностей взаимодействующих молекул. Другими словами места расположения

групп, образующих водородные связи, на поверхности взаимодействующих молекул служат важными «ориентирами», обеспечивающими точное совмещение поверхностей этих молекул. Однако силы, обуславливающие агрегацию многих органических молекул и их связывание друг с другом в водных растворах, не ограничиваются водородными связями.

Термин гидрофобная связь или, точнее *гидрофобное взаимодействие* используется при описании взаимодействий между неполярными группами веществ и белков. Удобной моделью, объясняющей этот тип взаимодействия, является процесс перехода гидрофобной молекулы из инертного растворителя (тетрахлорметан) в воду. При этом наблюдаются две основные стадии. 1) В воде образуется «полость», размер которой примерно соответствует размеру растворенной молекулы. Свободная энергия образования такой полости довольно велика, поскольку этот процесс сопровождается разрывом большого числа водородных связей. В основном энтальпийный (ΔH) эффект. 2) Теперь молекулы воды будут стремиться изменить свою ориентацию, приспособившись к присутствию в полости неполярной молекулы. Ясно, что они переориентируются таким образом, чтобы обеспечить оптимальные условия для вандерваальсовых взаимодействий и образовать максимальное число водородных связей. В результате такой переориентации число водородных связей может даже увеличиться, поскольку водородные связи в воде могут образовываться самым разным образом. Особенно это относится к низким температурам, когда в воде присутствуют в значительном количестве льдоподобные структуры. Во многих случаях ограничение подвижности молекул воды, окружающих гидрофобные группы, т. е. возрастание структурированности воды, оказывается самым важным результатом действия гидрофобных сил. При растворении углеводов энтальпия образования новых водородных связей почти полностью компенсируется энтальпией образования полости. В результате суммарное изменение энтальпии (ΔH) при переходе неполярных молекул из инертного растворителя в воду обычно

близко к нулю (как правило, это небольшая положительная или отрицательная величина). Вместе с тем уменьшение подвижности молекул воды приводит к значительному уменьшению энтропии, т. е. дает отрицательное значение ΔS . Поскольку $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, а член $T\Delta S$ положителен, изменение свободной энергии при переходе гидрофобной молекулы из инертного растворителя в воду также является величиной положительной, т. е. такой переход невыгоден с энергетической точки зрения. Именно этим объясняется плохая растворимость углеводов в воде.

По тем же причинам молекулы углеводов стремятся агрегировать в воде. Процесс образования гидрофобной связи можно представить себе как перемещение неполярных частей молекул из воды в «гидрофобные» области, образуемые за счет ассоциации этих частей. В результате неполярные части оказываются в непосредственной близости друг от друга, т. е. как бы в окружении неполярного растворителя. Вследствие такого перемещения происходит уменьшение числа молекул воды, контактирующих с гидрофобными участками растворенного вещества, т. е. разрушение части областей структурированной воды, окружающих гидрофобные поверхности, в результате чего энтропия раствора возрастает. Следовательно, образование гидрофобной связи между двумя углеводородными молекулами или алкильными группами сопровождается обычно увеличением энтропии. Поскольку энтропийный член $T\Delta S$ чаще всего вносит наибольший вклад в величину свободной энергии, определяющую значение константы K , часто говорят, что гидрофобное связывание имеет энтропийную природу. Однако, как подчеркивал Дженкс, важную роль в гидрофобном взаимодействии играет сильно выраженная способность молекул воды «сцепляться» друг с другом, вследствие чего заметный вклад может вносить не только энтропийный член, но и энтальпийная составляющая свободной энергии.

В зависимости от характера взаимодействия растворенного вещества с водой энтропия образования гидрофобных связей (ΔS) может быть иногда равной нулю или даже отрицательной. Именно это имеет место в случае гетероциклических соединений,

которые содержат как гидрофобные участки, так и полярные группы, способные образовывать водородные связи с водой. Хотя эти группы действительно образуют водородные связи, тем не менее они все же вызывают уменьшение структурированности окружающей их воды. Это уменьшение иногда компенсирует или даже превышает то возрастание структурированности, которое имеет место в областях, окружающих гидрофобные участки. Следовательно, изменение энтропии при переносе гетероциклических молекул в воду может быть положительным. И наоборот, изменение энтропии при ассоциации гетероциклических молекул в воде может быть отрицательным.

Поскольку структурированность воды, окружающей гетероциклические основания, меньше, чем воды, окружающей полностью неполярные молекулы, изменение энтальпии, которое сопровождает гидрофобную ассоциацию гетероциклических молекул, может быть достаточно отрицательным, чтобы ассоциация оказалась выгодной, даже несмотря на уменьшение энтропии.

Константа образования K_f при гидрофобной ассоциации часто возрастает с ростом температур, что отличает процесс гидрофобного взаимодействия от большинства реакций ассоциации с участием полярных молекул.

Из уравнения $R \ln K_f = -\Delta G^0/T = -\Delta H^0/T + \Delta S^0$ видно, что для образования прочных ассоциатов необходимо, чтобы либо величина ΔH^0 имела достаточно большое отрицательное значение, либо ΔS^0 было достаточно большой положительной величиной. Если ΔH отрицательно, как это имеет место для большинства экзергонических реакций (например, при протонировании $\text{NH}_3 \Delta H^0 = -52 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$), то K_f будет уменьшаться с повышением температуры. Однако если ΔS^0 — это большая положительная величина, ΔH^0 может быть и положительным, что часто наблюдается при образовании гидрофобных ассоциатов. В этом случае K_f будет возрастать с ростом температуры (табл. 3.2).

Возрастание стабильности при повышении температуры иногда используют в качестве показателя гидрофобной природы связывания.

Общая характеристика межмолекулярных сил взаимодействия представлена в табл. 3.2.

Таблица 3.2

Характеристики межмолекулярных сил взаимодействия

Тип межмолекулярных сил	Взаимодействие имеет место между группами	Молекулярные характеристики для межмолекулярной силы	Зависимость от температуры	Типы молекул, вовлеченных во взаимодействие
Водородные и гидрофобные связи	Некоторые типы $\text{OH}, =\text{NH}, -\text{O}^-, \equiv\text{N}^+$ и др.	Кислотность (рН) основность партнера, pK_a	Сильная	Спирты, кислоты, амины и др.
Дисперсионные силы	Полярные, соответственно неполярные (атомный диполь)	Степень поляризации α , энергия, ионизация, I	Практически не зависит	Все типы молекул, полярные и неполярные
Диполь-диполь	Постоянный диполь	Дипольный момент μ	Сильная	Полярные молекулы
Индукированный диполь	Постоянный диполь с индуцированным диполем	α, μ	Слабая	Полярные, поляризуемые
Электростатические силы	Ионы	Заряд e , диэлектрическая постоянная среды, ϵ	Слабая	Электролиты (органические и неорганические)
Ион-диполь	Ионы — постоянные диполи	e, μ, ϵ	Средняя	Электролиты и полярные молекулы
Ион-индуцированный диполь	Ионы и поляризуемые группы	e, μ, ϵ	Слабая	Электролиты и поляризуемые молекулы

3.2. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ПРОЧНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ

При проведении молекулярно-биологических исследований в рамках LADMER постоянно возникает необходимость оценить прочность связывания малых и больших молекул. В настоящем разделе мы остановимся на общих положениях, касающихся этой проблемы. В каждом конкретном случае нами будут сделаны дополнения, которые характеризуют данный тип связывания (например рецепторы, ферменты) с последующим объяснением определенной специфики взаимодействия с лекарственными средствами.

Обратимся к уравнению 3.1, в котором показана способность молекул X связываться с молекулами P . Оценить количественно такую связь можно с помощью изменения концентраций X и P и определяя как меняется при этом концентрация комплекса PX .

Всегда величина этого изменения должна возрасть по мере увеличения концентрации X при сохранении концентрации молекул P постоянной. Обычно молярная концентрация P в опытах бывает мала, а концентрация X варьируют в весьма широких пределах. В этих условиях, при достаточно больших значениях $[X]$, большая часть молекул P переходит в PX и изменение какого-то свойства (допустим ΔA) перестает возрастать. Этот эффект, известный под названием *насыщение*, наблюдался в большинстве работ по исследованию процесса связывания, а также во многих физиологических процессах.

Свойство или изменение свойства, которое количественно характеризует (ΔA), при насыщении (т. е. когда вещество P переходит в PX) достигает максимального значения — ΔA_{\max} . Отношение $[PX]$ к суммарной концентрации всех форм P , присутствующих в растворе $[P]_{\text{полн}}$, называется *степенью насыщения* и обозначается через \bar{y} . Если молекула P имеет более одного центра связывания для X , то величина характеризует

долю занятых центров от общего числа центров связывания. Если обозначить через n число центров связывания в расчете на одну молекулу, то общее число центров связывания будет равно $n[P]$. Величину \bar{y} часто принимают равной $\Delta A/\Delta A_{\max}$. Для макромолекул с несколькими центрами связывания это равенство соблюдается только при условии, что добавление каждой новой молекулы X приводит к одинаковому изменению A . Это условие выполняется не всегда, однако если оно выполняется, то должно выполняться и следующее соотношение:

$$\sum_i \frac{[PX_i]}{n[P]_{\text{полн}}} = \bar{y} = \frac{\Delta A}{\Delta A_{\max}}. \quad (3.8)$$

Индекс i обозначает число лигандов X , связанных с P ; он может меняться от 0 до n . При $n=1$ степень насыщения \bar{y} и величину ΔA можно выразить через концентрацию несвязанного X и константу образования. Соответствующие соотношения имеют вид:

$$\bar{y} = \frac{K_f[X]}{1 + K_f[X]}; \quad \Delta A = \frac{\Delta A_{\max} K_f[X]}{1 + K_f[X]}. \quad (3.9)$$

На рис. 3.2 приведена кривая, характеризующая зависимость \bar{y} (или ΔA) от $[X]$ для некоторой гипотетической реакции (эту кривую иногда называют изотермой адсорбции, поскольку для получения достоверных результатов эксперименты следует проводить при постоянной температуре). Из рис. 3.2 и уравнения 3.9 можно видеть, что когда величина $[X]$ в точности равна $1/K_f$ (или K_d), то $\bar{y} = 0,5$. Видно также, что насыщение достигается медленно, и даже в точке, соответствующей наибольшей концентрации $X(8/K_f)$, степень насыщения не превышает 90 %. Поскольку обычно в опытах измеряется ΔA (а не \bar{y}), из кривой такого типа трудно определить предельное значение ΔA_{\max} (за исключением случаев, когда величина K_f очень велика). Однако для определения K_f необходимо знать именно ΔA_{\max} . В связи

с этим графики, подобные представленному на рис. 3.2 используются редко, и он приведен нами здесь в основном для иллюстрации вводимых определений.

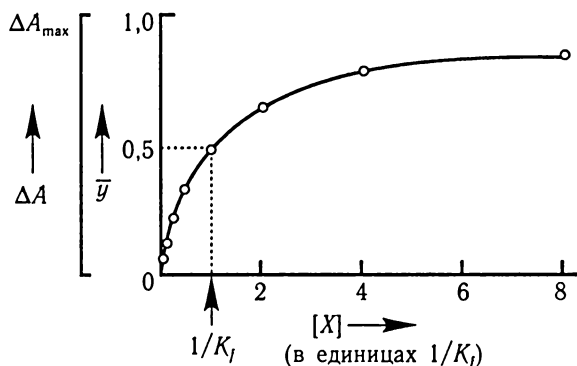


Рис. 3.2. Изотерма адсорбции — зависимость степени насыщения \bar{y} (или изменение какого-нибудь свойства ΔA) от концентрации вещества $[X]$, обратимо связывающего с макромолекулой. Кривая носит гиперболический характер при $\bar{y} = 0,5[X] = 1/K_f$

Кривая, изображенная на рис. 3.2 — это равнобочная гипербола в координатах $\{[X]; \bar{y}\}$; поэтому кривые насыщения такого типа часто называют *гиперболическими*. Это название подчеркивает отличие изотермы адсорбции от кривых связывания несколько другого вида, которые в тех же координатах носят *сигмоидный* (*S-образный*) характер.

Зачастую более удобно строить графики в других координатах, а именно $\{\lg[X]; \bar{y}\}$ (рис. 3.3).

Перечислим причины, по которым эти координаты более удобны: 1) Кривая становится симметричной относительно средней точки, где $\lg[X] = -\lg K_f$. 2) Независимо от того, насколько велик диапазон используемых концентраций X , всегда можно выбрать масштаб, при котором все точки уместятся на одном листе бумаги. 3) Расстояние между точками на кривой, построенной в указанных координатах $\{[X]; \bar{y}\}$ (сравните графики, приведенные на рис. 3.2 и 3.3, на которых экспериментальные точки соответствуют одним и тем же данным, причем каждое последующее

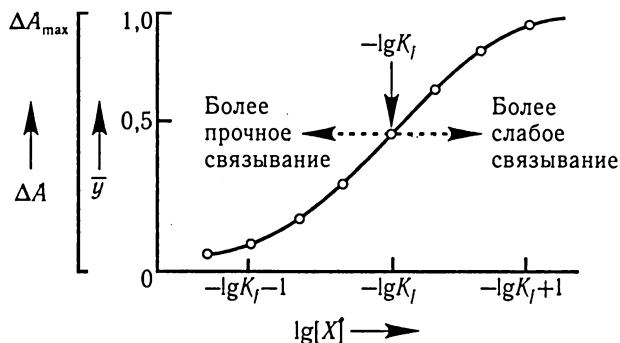


Рис. 3.3. Кривая насыщения в полулогарифмическом масштабе, построенная по тем же точкам, что и кривая на рис. 4.1

значение $[X]$ в два раза больше предыдущего). 4) Логарифмическая шкала такого типа может быть использована для всех соединений, независимо от прочности связывания, и форма кривых для всех комплексов с соотношением компонентов 1:1 одинакова. Наклон кривой $dy/d \lg[X]$ в средней точке равен 0,576; изменение величины $\lg[X]$ при переходе от степени насыщения 10 % к степени насыщения 90 % составляет 1,81. Аналогичные кривые хорошо знакомы химикам, поскольку они напоминают по форме кривые титрования, в которых вместо $-\lg[X]$ используется pH. При переходе от более слабого комплекса к более прочному кривая смещается влево, и наоборот. Кривые такого типа очень удобно описывать математически с помощью гиперболических функций.

Для графического представления данных по насыщению часто используют другую систему координат, известных под названием координат Скэтчарда (рис. 3.4).

При этом по одной оси откладывают величину $\Delta A/[X]$ (или $\bar{y}/[X]$), а по другой — ΔA (или \bar{y}), в результате чего точки ложатся на прямую. Из уравнения 3.10, непосредственно вытекающего из уравнения 3.9, следует, что отрезок, отсекаемый прямой на оси абсцисс, и наклон прямой непосредственно дают значения ΔA_{\max} и K_f .

$$\bar{y}/[X] = K_f - \bar{y}K_f, \quad \Delta A/[X] = \Delta A_{\max} K_f - \Delta A K_f. \quad (3.10)$$

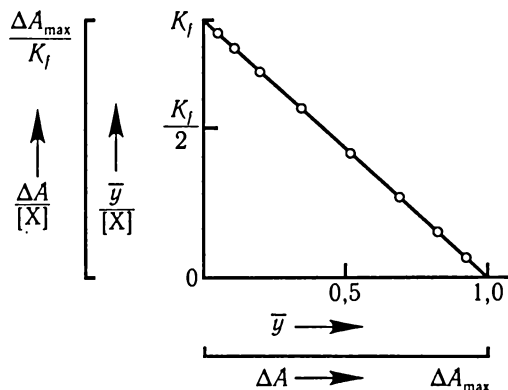
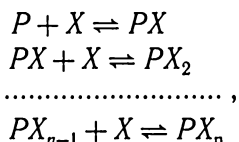


Рис. 3.4. График Скэтчарда, построенный по тем же точкам, что и кривые на рис. 4.1 и 4.2. Это самый удобный линейный график для анализа данных по связыванию

Все вышеизложенное отражает равновесие при участии одного связывающего центра, т. е. в уравнении 3.1 лиганд с белком связываются в отношении 1:1.

Если белок имеет несколько связывающих центров, как это чаще всего бывает в действительности, то соответствующее равновесие можно представить в следующем виде:



где n — количество эквивалентных и независимых связывающих центров в молекуле белка. Термодинамическое рассмотрение этой системы весьма сложно и здесь не будет описано. Предлагаем лишь конечный результат:

$$r = \frac{n[X]}{K_d + [X]}. \quad (3.11)$$

Величина r — равна отношению полной концентрации лиганда X , несвязанного с белком P , к полной концентрации всех форм белка P .

$$r = \frac{\text{полная концентрация } X, \text{ связанного с } P}{\text{полная концентрация всех форм } P} = \frac{[PX]}{[P] + [PX]}.$$

K_d — среднее пропорциональное из всех констант диссоциации, т. е. $K_d = (K_1, K_2, \dots, K_n)^{1/n}$.

Уравнение 3.11 можно преобразовать двумя способами к виду, удобному для обработки экспериментальных данных.

Один из этих этапов:

$$\frac{1}{2} = \frac{1}{n} + \frac{\dot{K}}{n[x]}. \quad (3.12)$$

Это равенство известно под названием Хью-Клотца. График зависимости $1/r$ от $1/[x]$ представляет собой прямую. Тангенс угла наклона равен K_d/n , а пересечение с осью ординат дает $1/n$. Уравнение 3.11 можно переписать так же и в виде

$$\frac{r}{[x]} = \frac{n}{K_d} - \frac{r}{K_d}. \quad (3.13)$$

График зависимости $r/[x]$ от r также представляет собой прямую. Тангенс угла наклона равен $-1/K_d$, а точка пересечения с осью ординат дает n/K_d . В этой форме уравнение называется уравнением Скэтчарда.

Величины r и $[X]$ можно определить многими методами, например равновесным диализом или спектроскопически (оптические спектры поглощения, флуоресценции, спектры магнитного резонанса). В заключение отметим, что многие белки имеют неэквивалентные связывающие центры, которые могут быть зависимыми или независимыми друг от друга. Это обстоятельство проявляется в том, что графики, построенные по уравнениям 3.12 и 3.13, оказываются не прямолинейными.

Рассмотрение равновесия такого типа достаточно сложное и включает так называемые микроскопические константы связывания [14].

3.3. СТЕРЕОСПЕЦИФИЧНОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ С БЕЛКАМИ

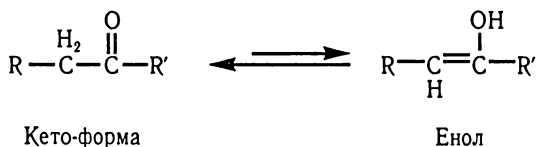
Комплементарность связывания малых и больших молекул в биологических системах в значительной степени зависит от стереоспецифических свойств первых. Это уже хорошо известный факт, на основе которого объясняются также фундаментальные проблемы как стереоспецифичность действия лекарств [16], стереохимическая специфичность ферментов [17].

Различают несколько видов изомерных химических соединений: химическая, таутомерия, оптическая, геометрическая и конформационная [10, 18].

1. Химическая изомерия может быть проиллюстрирована на примере бензола. Все углеродные атомы в бензольном кольце равноценны, замещение любого водородного атома любой группой (гидроксил, аминогруппой, метил) приводит к одному и тому же монозамещенному продукту. В случае уже имеющегося в конце бензола заместителя, вторая группа может находиться в *орто*-, *мета*- и *пара*-положениях относительно его. Это три так называемых химических изомера, имеющих одинаковую химическую формулу, но отличающихся различными физико-химическими свойствами.

Многие простые органические соединения существуют в виде смеси двух и более изомеров, или таутомерных форм, быстро переходящих одна в другую. Таутомеры, по крайней мере в принципе, можно разделить при низких температурах, когда переход из одной формы в другую затруднен.

Классическим примером явления такого рода служит кето-енольное равновесие.



Хотя енол обычно менее устойчив, чем кето-форма, он все-таки всегда присутствует в системе, хотя и в малых количествах. Енол легко образуется из кето-таутомера благодаря тому, что атомы водорода при углероде, связанном с карбонильной группой ($C=O$), имеют отчетливо выраженные кислотные свойства. Один из основных факторов, порождающих таутомерию, — наличие высоко диссоциирующего протона. Однако обычно атомы водорода, связанные с атомами углерода, слабо диссоциируют, и поэтому таутомерия возникает лишь в присутствии карбонильной или какой-либо другой «активирующей группы».

Как правило, легко диссоциируют протоны, связанные с атомами кислорода или азота, предопределяя возможность таутомерии в амидах и гетероциклических соединениях.

Для молекулы, в которой один из атомов углерода связан с четырьмя другими, и при том разными, атомами или группами атомов, возможны две разные пространственные конфигурации, которые относятся одна к другой как предмет к своему зеркальному отражению. Один из таких изомеров вращает плоскость поляризации света в одном направлении, а другой — в противоположном.

Для оптических изомеров могут быть использованы проекции Фишера (D — L -номенклатура) и терминология Канна—Ингольда—Прелога (R — S -обозначения).

По соглашению, предложенному Э. Фишером (1891), например аминокислота находится в L -конфигурации если ее аминогруппа оказывается слева, и в D -конфигурации, если она оказывается справа.

Одно и тоже соединение, находящееся в L - и D -формах называют энантиомерами. Что же касается углеродного атома, ответственного за асимметрию, то его называют асимметрическим. В настоящее время чаще используют термин хиральные молекулы, хиральные центры, хиральность (что в переводе с греческого означает «принадлежность к правому или левому»). Соединения с одним хиральным центром дают одну пару

энантиомеров, а молекулы с двумя и более хиральными центрами образуют семейство диастереомеров.

Поскольку пользоваться *D—L*-номенклатурой, не установив направление ориентации проекционной формулы нельзя, и поскольку многие соединения содержат более одного асимметрического углерода, в 1956 г. Р. С. Канном, Д. К. Ингольдом и В. Прелогом была разработана *R—S*-система обозначений пространственной конфигурации соединений, в которой *R* обозначает правый (rectus), а *S* — левый (sinister).

Пространственную конфигурацию заместителей около каждого асимметрического атома углерода обозначают в соответствии со следующими правилами:

1. Отмечают атомный номер каждого из атомов, непосредственно присоединенных к рассматриваемому асимметрическому атому углерода;

2. Располагают эти атомы в порядке убывания атомного номера;

3. Если заместителями у асимметрического атома углерода являются два атома с одним и тем же атомным номером (например, два других атома углерода), принимают во внимание атомный номер заместителей у этих присоединенных атомов. Атом с заместителем, имеющим более высокий атомный номер, помещают перед атомом, заместитель которого имеет меньший атомный номер. Порядок старшинства частот, встречающихся заместителей у асимметрического углерода, следующий: I, Br, Cl, SH, OH, NH₂, COOR, COOH, CHO, CR₂OH, CHONR, CH₂OH, C₆H₅, CH₂R, CH₃, H. Атомы, связанные двойной и тройной связями, считают соответственно дважды или трижды;

4. Располагают асимметрический атом углерода так, чтобы атом, обладающий самым низким атомным номером (чаще всего H), смотрел в сторону, противоположную глазу наблюдателя. В двумерной проекции нижнее положение эквивалентно положению сзади в трехмерной модели;

5. Рассматривают три заместителя, расположенные спереди от асимметрического углеродного атома. (Напомним, что

атом, имеющий самый низкий атомный номер, находится позади асимметрического атома углерода). Определяют, как расположены атомы в порядке убывания атомного номера — по часовой стрелке (правая конфигурация *R*) или против часовой стрелки (левая конфигурация *S*).

Например, в глицериновом альдегиде порядок заместителей, присоединенных к асимметрическому атому углерода, в соответствии с приведенными выше правилами будет OH, CHO, CR₂OH и H. Для того чтобы определить, каким будет асимметрический углерод, — *R* или *S*, расположим молекулу так, чтобы атом H находился внизу в двумерной формуле или позади асимметрического атома углерода в трехмерной формуле (см. правило 4).

При создании новых лекарственных веществ, имеющих хиральные центры, следует иметь в виду, что различные энантиомеры могут обладать различным, и даже противоположным, биологическим действием.

В случаях хиральной зависимости биоактивности асимметрический центр в молекулах лекарственного вещества должен ориентироваться тремя точками на хиральном участке биорецептора, чувствительном к асимметрии препарата. При их «нормальном взаимодействии», т. е. комплементарном трехточечном контакте (*W—W'*, *Y—Y'*, *Z—Z'*, рис. 3.5, а), проявляется полезный лечебный эффект. Второй же антипод оказывается некомплементарен активному участку рецептора (рис. 3.5, б: *W—W'*, *Y—Y'*, а *Z* не взаимодействует с *Z'*) и может иметь менее выраженный лечебный эффект (или совсем не проявить его) или даже оказаться токсичным веществом.

Так, установлено, что левовращающий энантиомер кокаина почти в два раза более активен в качестве местного анестетика и в четыре раза менее токсичен, чем его правовращающий оптический антипод. Очевидно, что требование двухточечного контакта лекарственного вещества с рецептором снимает различия в биодействии оптических изомеров. В настоящее время среди поставляемых на фармацевтический рынок хиральных

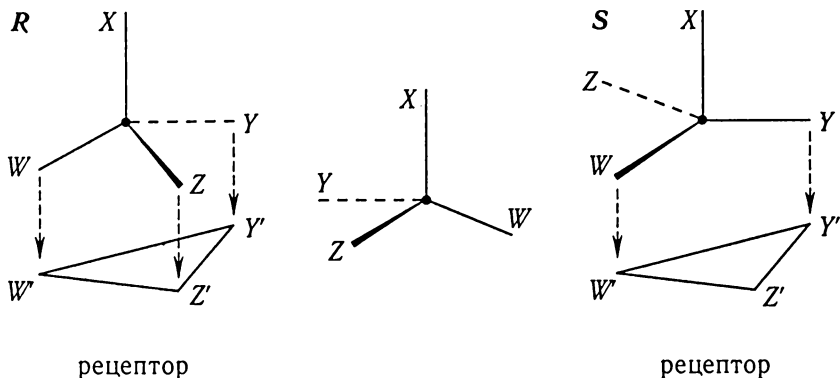
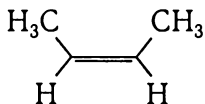


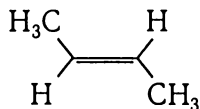
Рис. 3.5. Взаимодействие энантимеров лекарства с биологической мишенью: а) комплементарное (трехточечное); б) аномальное (двухточечное)

лекарственных веществ лишь 15 % производится в виде индивидуальных стереоизомеров (остальные — в виде рацематов или диастереомеров).

Если молекула содержит атомы углерода, связанные двойной связью, и два различающихся атома или группы, присоединенные к этим углеродным атомам, то такая пространственная изомерия называется геометрической, или *цис*-, *транс*-изомерией. Геометрические изомеры, подобно химическим изомерам, отличаются по физическим свойствам, например по температурам кипения. Ниже приведен пример геометрических изомеров:



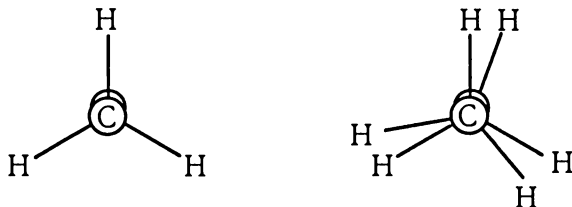
цис-бутен-2



транс-бутен-2

Приставки *цис*- и *транс*- указывают, что одинаковые заместители находятся по одну сторону двойной связи или накрест по отношению к двойной связи. Цифра в названии *транс*-бутен-2 указывает положение двойной связи.

В связи с возможностью вращения вокруг одинарных (простых) связей молекулы насыщенных ациклических соединений способны существовать в самых разнообразных формах, легко превращающихся одна в другую. В отличие от производных этилена эти соединения не удается выделить в виде стабильных *цис*- и *транс*-изомеров. На этом основании долгое время считали, что вращение вокруг углерод—углеродных и иных простых связей совершенно свободно. Однако в действительности оказалось, что вращение вокруг простых связей в той или иной степени заморожено. Даже в случае простейшего соединения этого типа — этана — существует энергетический барьер для свободного вращения, равный приблизительно 3 ккал/моль. Наличие этого барьера связано с тем, что при вращении метильных групп относительно друг друга их атомы водорода поочередно располагаются то в шахматном порядке, то заслоняя друг друга.



Заслоненная форма является невыгодной, неустойчивой в связи с наличием сил отталкивания между тремя парами максимально сближенных атомов водорода. Напротив, форма молекулы, в которой атомы водорода расположены в шахматном порядке, обладает минимумом потенциальной энергии и поэтому является наиболее устойчивой, «заторможенной».

Отдельные возможные формы, которые молекула способна принимать в пространстве вследствие вращения отдельных ее частей вокруг простых связей, называются *конформациями*. Конформации, отвечающие относительному минимуму потенциальной энергии (устойчивые или «предпочтительные» конформации),

называют конформационными или поворотными изомерами, или короче, — конформерами.

Большое значение конформационная изомерия имеет для циклических соединений, в частности для производных циклогексана и конденсированных полициклических систем типа стероидов. Определенные конформеры этих соединений проявляют значительно большую стабильность, чем это имеет место в случае соединений с открытой цепью. Так, с помощью современных методов исследования показано, что циклогексан при обычной температуре существует почти исключительно в форме «кресла» в которой имеется два вида атомов водорода: шесть из них расположены в «средней» плоскости кольца, снаружи его (они называются экваториальными водородами) и шесть (по три через один, сверху и снизу кольца) — вне этой плоскости. Они носят название аксиальных водородов, поскольку их связи с углеродными атомами параллельны оси симметрии цикла.

Часто определенные конформации как циклических, так и нециклических соединений стабилизируются вследствие образования внутримолекулярных, например водородных, связей. Сложные молекулы белков, несмотря на то, что атомы их «скелета» связаны большим числом простых связей, существуют в виде достаточно определенных конформаций, именно благодаря множественным внутримолекулярным водородным и некоторым иным связям.

Следует отметить, что конформация молекулы определяет не только ее форму, но во многих случаях и ее реакционную способность. Особенно это важно в случае таких сложных реакций, как взаимодействие физиологически активных веществ с чувствительными к ним биологическими структурами (ферменты, рецепторы), где, по-видимому, исключительное значение имеют строгая комплементарность и специфическая реакционная способность.

Отсюда, естественно, вытекает предположение, что биологическая активность многих веществ должна зависеть от способности их молекул существовать в виде определенных конформаций, наиболее благоприятных для взаимодействия

с соответствующим рецептором (ферментом). Поэтому не удивительно, что в последние годы в ряде работ, посвященных изучению молекулярного механизма действия некоторых физиологически активных веществ, большое внимание уделяется конформации их молекул. В некоторых случаях конформация определялась экспериментально для кристаллических веществ с помощью рентгеноструктурного анализа. Наряду с этим осуществлялось определение наиболее вероятных конформаций путем квантово-химических расчетов. Использование этих данных позволило значительно глубже понять механизм первичной фармакологической реакции некоторых веществ и высказать значительно более обоснованные предположения о строении соответствующих биорецепторов.

В связи с обсуждаемой проблемой необходимо остановиться еще на двух ее аспектах. В первую очередь это касается ферментативного превращения лекарств. Существует по крайней мере, четыре ситуации, встречающиеся в этом виде катализа [19, 20]:

1. Стереοизбирательное (частичное или полное) превращение одного из изомеров (субстратов) в продукт (или продукты) реакции.

2. Избирательное (в большинстве случаев частичное) образование хирального продукта реакции.

3. Стереοизбирательный метаболизм рацематов или изомеров, приводящих к образованию хиральных центров.

4. Процессы изомеризации.

В последнее время широкое распространение нашли исследования взаимосвязи структуры и свойств (SAR) химических веществ. В LADMER-системе такими свойствами могут быть: фармакологическая активность, биодоступность, объем распределения, клиренс и др. Одним из фундаментальных показателей химической структуры является ее пространственное (*D*-dimensional) расположение. Отсюда возможно описание молекулы в одномерном (1—*D*) пространстве (формула, например C_6H_6) в двумерном (2—*D*) пространстве (бензольное кольцо) или в трехмерном (3—*D*) при наличии изомерии (Глава 12).

3.4. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ЛИПИДНЫМ БИСЛОЕМ МЕМБРАН

Изучая процессы связывания лекарственных средств с белком (разделы 3.2—3.3) можно определить: 1) число центров связывания на молекуле белка; 2) сродство центра связывания к лиганду; 3) степень взаимодействия между центрами связывания, т. е. кооперативность. Экспериментально все эти характеристики можно получить из анализа кривой связывания (или изотермы адсорбции), т. е. зависимости количества связанного лиганда от концентрации свободного (несвязанного) лиганда. Анализ такой зависимости относительно несложен, поскольку имеется лишь фиксированное число центров связывания, которые могут быть либо заняты, либо свободны. Такой же подход применим при изучении связывания лекарств с определенным центром на мембране (каналом, рецептором).

Анализ адсорбции молекул на поверхности липидного бислоя, однако более сложен, поскольку в этом случае понятие центра связывания не столь однозначно. Формальный термодинамический анализ связывания с мембраной даже небольших молекул может оказаться весьма сложным, и часто для этого недостаточно простого применения стандартных уравнений. Подход, который следует использовать в этом случае, и информация, которую можно получить, зависят от конкретной экспериментальной задачи. Как правило, экспериментаторы используют несколько таких подходов (моделей).

1. Модель равновесного распределения

Она рассматривает мембрану как отдельную фазу. Небольшие молекулы распределяются между водной фазой и мембраной в соответствии с коэффициентом распределения K_p .

$$K_p = \frac{C_{\text{связ}}}{C_{\text{своб}}},$$

где $C_{\text{связ}}$ и $C_{\text{своб}}$ — концентрации связанного с мембраной и свободного лиганда соответственно. В такой модели насыщение отсутствует, т. е. концентрация связанного лиганда будет расти до бесконечности с увеличением его концентрации в водной фазе. Естественно, это нереальная ситуация, и данная модель применима только в том случае, если количество связанного лиганда относительно мало. Отметим, что в данной модели не содержится никакой информации о центрах связывания.

Коэффициент распределения можно выразить несколькими способами (длины, см или объема, моль/объем). В литературе [18] используют оба типа коэффициентов распределения.

2. Изотерма адсорбции Лэнгмюра

В этой модели мембрана рассматривается как регуляторная решетка, состоящая из потенциальных центров связывания. Если максимальная концентрация связанного лиганда равна $C_{\text{связ}}^{\text{max}}$, то можно определить долю занятых лигандов центров Q как:

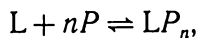
$$Q = \frac{C_{\text{связ}}}{C_{\text{связ}}^{\text{max}}}.$$

Тогда доля незанятых центров равна $1-Q$, а константа связывания может быть представлена в виде:

$$K_L = \frac{Q}{(1-Q)C_{\text{своб}}} = \frac{C_{\text{связ}}}{[C_{\text{своб.центры}}]C_{\text{своб}}}.$$

Согласно этой модели, концентрация центров связывания фиксирована, а сами они независимы, эквиваленты и неподвижны. Серьезный недостаток такого подхода состоит в том, что во многих случаях центры связывания — это не какие-то дискретные участки на бислойе, каждый из которых может быть представлен единственной фиксированной ячейкой решетки. Поэтому определить реальное число доступных центров связывания оказывается не так просто, поскольку потенциальные центры связывания перекрываются.

Подсчет перекрывающихся центров связывания необходимо проводить исходя из простого равновесия связывания лиганда с n молекулами фосфолипида. В этом случае образование комплекса между лигандом L и фосфолипидами P можно представить в следующем виде:



$$K_a = \frac{[LP_n]}{[L][P]^n}.$$

Такой способ с успехом применяется, например, для анализа связывания ионов кальция с фосфатидилхолиновым бислоем с $n=2$, которое нельзя описать с помощью простой изотермы Ленгмюра. Получаемое в рамках такой модели уравнение показывает, что график Скэтчарда должен быть не линейным, а вогнутым. Отметим также, что в настоящем разделе под термином связывания мы подразумевали как адсорбцию на поверхности, так и проникновение лиганда внутрь бислоя (растворение).

В зависимости от полярности низкомолекулярных соединений, способных взаимодействовать с липидным бислоем мембран, их классифицируют как неполярные, амфифильные и ионные.

В большинстве случаев такие *неполярные* молекулы, как гексан, локализуются в центре бислоя. Многие анестетики и лекарственные препараты, биологическая активность, которых зависит от их способности взаимодействовать с мембраной (транквилизаторы, антибиотики, соли желчных кислот, жирные кислоты) относятся к *амфифильным* соединениям. Все они имеют четко различимые полярные и неполярные части молекулы и эффективно взаимодействуют с поверхностью мембран. Некоторые из них при достаточно больших концентрациях действуют на мембрану как детергенты и разрушают бислои.

Гидрофобные ионы, в которых заряженная группа находится в окружении неполярных групп, чем они отличаются от

простых амфифильных соединений, у которых полярная и неполярная части молекулы разделены. При связывании амфифильной молекулы с мембраной ее полярная группа оказывается локализованной ближе к водной фазе, а неполярная — погруженной в бислой. У гидрофобных ионов заряженная часть по крайней мере на несколько ангстрем проникает в гидрофобную область мембраны. Гидрофобными ионами являются макроциклические ионофоры.

КИНЕТИКА

При рассмотрении кислотно-основных процессов электролитической диссоциации (Глава 2), связывании малых молекул большими (Глава 3), мы сосредоточили внимание в основном на равновесных процессах, особенно на использовании констант равновесия.

Теперь мы рассмотрим специфическую область, посвященную исследованию скорости и механизмов химических и биохимических реакций, известную под общим названием кинетика [2—4, 21]. Понятие скорости было в центре нашего внимания (Глава 2, 3) благодаря применению закона действия масс для объяснения соответствующих процессов. Он гласит, что *скорость химической реакции пропорциональна активным массам реагентов*. Использование этого принципа приводит к общим выражениям для скорости, в которых каждая активная масса или активность, (а для наших целей — концентрация), возводится в степень, соответствующую значению ее коэффициента в стехиометрическом уравнении реакции. В качестве самого простого примера возьмем реакцию $A \rightarrow \text{Продукты}$. Скорость распада A пропорциональна $[A]$, и если $nA + mB \rightarrow \text{Продукты}$, то скорость пропорциональна $[A]^n$ и $[B]^m$.

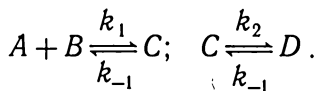
Стрелка в этих уравнениях показывает, что мы рассматриваем скорость реакции только в этом направлении. Однако при необходимости мы будем специально указывать, какая скорость (прямой или обратной реакции) имеется в виду. Если проводят расчеты, (а это неизбежно в подобных исследованиях), то знак пропорциональности должен быть заменен на знак равенства — такая операция становится возможной при введении коэффициента пропорциональности k . Теперь уравнение для одного реагента можно записать в следующем виде:

$$v_n = k[A],$$

а для двух реагентов:

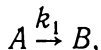
$$v_n = k[A]^n [B]^m,$$

причем в этих уравнениях коэффициенты отличаются друг от друга, а v_n означает скорость прямой реакции. Коэффициенты пропорциональности называют *константами скорости реакции* или просто *константами скорости* и снабжают нижним индексом. Например, если мы рассматриваем две последовательные реакции и нам необходимо указать константы скорости для всех прямых и обратных стадий, то мы нумеруем реакции и пишем константу со своим индексом над соответствующей стрелкой:



Некоторые исследователи предпочитают нумеровать константы скорости последовательными положительными индексами и вместо обозначений k_1 , k_{-1} , k_2 и k_{-2} используют обозначения k_1 , k_2 , k_3 , k_4 . В другой системе используют константы k_{1-2} , k_{2-1} , k_{3-4} , k_{4-3} .

Прежде чем рассматривать реакции различных типов и выбрать наиболее подходящий для них способ выражения скорости, необходимо ознакомиться с некоторыми правилами перевода информации из *химического* уравнения (или уравнений) в уравнение *скорости*. Рассмотрим уравнение



для которого, как мы уже видели, скорость реакции равна $k_1[A]$. Поскольку скорость реакции определяется как величина изменения (увеличения) концентрации продукта B в единицу времени, мы можем написать равенство

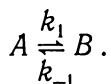
$$\text{Скорость} = d[B]/dt = k_1[A].$$

Скорость образования B равна скорости исчезновения A , поэтому мы можем написать равенство

$$dB/dt = -d[A]/dt,$$

где знак минус означает, что $[A]$ со временем уменьшается и что данное уравнение описывает именно скорость исчезновения реагента A .

Если мы допускаем, что B может превращаться в A , то уравнение будет выглядеть так:



Скорость прямой реакции, т. е. реакции превращения A в B , по-прежнему равна $k_1[A]$, а скорость обратной реакции равна $k_{-1}[B]$. Однако скорость изменения концентрации B теперь уже не равна $k_1[A]$, как это было раньше, поскольку $k_1[A]$ выражает лишь скорость, с которой B образуется из A . Для того чтобы выяснить, как со временем меняется концентрация, нам необходимо знать не только скорость, с которой B образуется из A , но также скорость расходования B для восстановления A . Если предположить, что A превращается в B без образования промежуточных продуктов, то скорость изменения концентрации B должна быть равна $dB/dt = k_1[A] - k_{-1}[B]$, (т. е. разности скоростей образования B из A и обратного превращения). Аналогичным образом для скорости изменения концентрации A имеем $dA/dt = k_{-1}[B] - k_1[A]$, (т. е. разность скоростей образования A из B и обратного процесса превращения в B). Аналогичным образом для скорости изменения концентрации A имеем $dA/dt = k_{-1}[B] - k_1[A]$, (т. е. разность скоростей образования A из B и обратного превращения в B). Отношение

$$\frac{d[B]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt}$$

вполне обоснованно. Равновесие наступает при равенстве скоростей прямой и обратной реакции, т. е. при условии, что скорость распада A равна скорости его образования. Поэтому при равновесии имеем

$$k_1[A] = k_{-1}[B],$$

$$\frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[B]}{[A]} = K_{eq}.$$

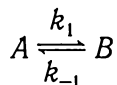
Преобразуя это выражение для случая равновесия, можно записать:

(Скорость распада A) — (Скорость образования A) = 0, что математически выражается как:

$$dA/dt = 0.$$

Это дифференциальное уравнение интерпретируется следующим образом: в условиях равновесия изменение концентрации A во времени равно нулю.

Представления об образовании и распаде компонентов можно применить к различным последовательно протекающим реакциям. Предположим, что за реакцией



следует сразу же реакция $B \xrightarrow{k_2} C$, скорость которой такова, что концентрация B со временем не меняется, т. е. скорость образования B равна скорости его распада. Такое состояние не является результатом равновесия, поскольку ни одна из реакций не достигла равновесия; оно называется «*стационарным состоянием*». В то время как одна молекула B превращается в молекулу C , другая молекула B , образовавшаяся в результате распада A , занимает ее место, и концентрация B остается

«стационарной», или постоянной. Для такого стационарного состояния можно написать:

Скорость исчезновения B = Скорость образования B ,
или

$$d[B]/dt = 0.$$

Используя для скорости применительно к образованию и распаду B , получаем:

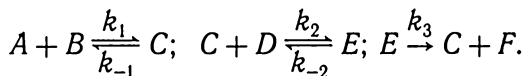
$$\text{Скорость образования } B = k_1[A];$$

$$\text{Скорость исчезновения } B = k_{-1}[B] + k_2[B].$$

Уравнение стационарного состояния для B имеет вид:

$$d[B]/dt = k_1[A] - (k_{-1} + k_2)[B] = 0.$$

Если вы будете изучать какую-либо более сложную реакцию, то необходимо знать как записывать выражения для скорости. В уравнениях, приведенных ниже, отражено появление в ходе реакции нескольких различных продуктов и реагентов:



Последовательность стадий выглядит следующим образом: A и B реагируют с образованием промежуточного продукта C ; C реагирует с D с образованием нового промежуточного продукта E и в заключении E распадается с образованием C и конечного продукта F . Предполагается, что последняя реакция необратима, потому для нее указана только одна стрелка. Поскольку C присутствует во всех трех уравнениях, напомним уравнение стационарного состояния для C и будем считать, что после достижения стационарного состояния, концентрация C остается постоянной:

$$d[C]/dt = 0 = \underset{\text{образование } C}{k_1[A][B] + (k_{-2} + k_3)[E]} - \underset{\text{исчезновение } C}{k_{-1}[C] - k_2[C][D]}.$$

Основная задача при написании уравнений состоит в определении всех путей реакции, ведущих к образованию C , и в объединении константы скорости и соответствующего реагента для каждого пути в терминах скорости. Это будут уравнения образования C . Аналогичный прием можно применить к реакциям, идущим в противоположном направлении, и получить уравнения исчезновения C . Затем сумма членов уравнений исчезновения C вычитается из суммы уравнений образования C и приравнивается к нулю для выполнения условия стационарности.

4.1. ПОРЯДОК РЕАКЦИИ

В кинетике различают реакции первого, второго, третьего, нулевого и даже дробного порядка. Порядок реакции — это число, равное сумме показателей степени концентраций реагирующих веществ в уравнении скорости. Так, например, если

$$\text{Скорость} = k[A],$$

то показатель степени A равен единице и, следовательно, это скорость *реакции первого порядка*. Если

$$\text{Скорость} = k[A]^2,$$

то показатель степени $[A] = 2$, и мы имеем дело с *реакцией второго порядка*.

Если

$$\text{Скорость} = k[A][B],$$

то сумма показателей степени $[A]$ и $[B] = 2$, и мы имеем дело с реакцией второго порядка. Если в уравнении скорости отсут-

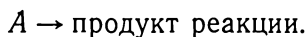
ствуется концентрация, т. е. скорость $= k$, то относится к *реакции нулевого порядка*. Реакции нулевого порядка протекают с постоянной скоростью и не зависят от концентрации реагентов. Так, например, в каталитической реакции, в которой концентрация реагента настолько превышает концентрацию катализатора, что катализатор все время полностью «насыщен» реагентом, реакция будет протекать с максимальной скоростью и на нее не будет влиять увеличение концентрации реагента.

Молекулярность реакции имеет прямое отношение к механизму реакции и характеризуется числом молекул, реагирующих в элементарном процессе реакции. Если реакция $A \rightarrow B$ означает, что одна молекула A распадается по единственному пути, то это будет мономолекулярная реакция. Если для образования продукта должны реагировать две молекулы, то такую реакцию следует считать бимолекулярной. Казалось бы, что порядок реакции должен соответствовать ее молекулярности, т. е. мономолекулярная реакция должна быть реакцией первого порядка, а бимолекулярная реакция — второго порядка. Однако во многих случаях кинетический порядок, определяемый экспериментально, не соответствует молекулярности. В таких случаях мы говорим о кажущемся порядке реакции.

Следует обратить внимание еще на один аспект рассматриваемой проблемы. Речь идет о бимолекулярных реакциях, и в особенности в объяснении зависимости скорости от концентрации исходя из двух стадий. Для этого обычно применяют тезис, что скорость первой реакции ниже, чем скорость второй. В таком случае общая скорость определяется скоростью первой стадии, которая называется *лимитирующей*.

Приведем основные характеристики трех наиболее часто встречающихся реакций целочисленного порядка [3].

1. Мы уже констатировали, что реакция нулевого порядка, а точнее ее скорость, не зависит от концентрации исходных веществ:



Имеем

$$\text{скорость} = -\frac{d[A]}{dt} = k. \quad (4.1)$$

Преобразуя уравнение 4.1, получим

$$d[A] = -k dt.$$

Интегрирование от $t=0$ до $t=t$ дает

$$\int_{[A]_0}^{[A]} d[A] = [A] - [A]_0 = -\int_0^t k dt = -kt,$$

или

$$[A] = [A]_0 - kt, \quad (4.2)$$

где $[A]_0$ и $[A]$ — концентрация при $t=0$ и $t=t$. График зависимости $[A]_0 - [A]$ от t представляет собой прямую линию, тангенс угла наклона которой равен k (рис. 4.1).

Реакций нулевого порядка очень мало, большая их часть является гетерогенными реакциями, протекающими на поверхности металла.

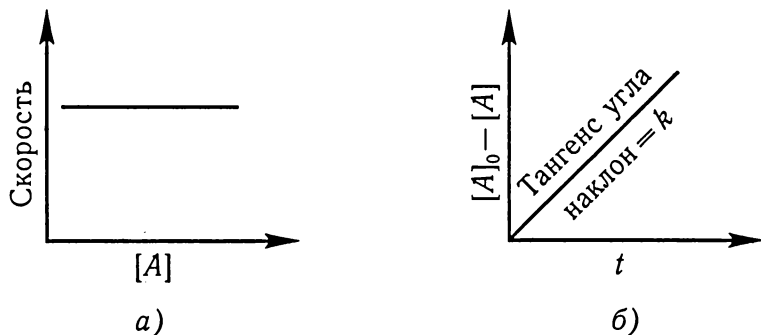


Рис. 4.1. Реакция нулевого порядка: а) — график зависимости скорости от концентрации реагирующего вещества; б) — график, основанный на уравнении 4.2

2. В случае реакции первого порядка ее скорость определяется следующим уравнением:

$$\text{скорость} = -\frac{d[A]}{dt} = kdt, \quad (4.3)$$

где $k(\text{с}^{-1})$ — константа скорости реакции первого порядка. После некоторых преобразований получим

$$-\frac{d[A]}{dt} = kdt.$$

Интегрируя от $t = 0$ до $t = t$, находим

$$\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]} = -\int_0^t kdt, \quad (4.4)$$

$$\ln \frac{[A]}{[A]_0} = -kt$$

или

$$[A] = [A]_0 e^{-kt}.$$

График зависимости $\ln([A]/[A]_0)$ от t представляет собой прямую линию, отрицательный тангенс угла наклона которой равен $-k$ (рис. 4.2).

Другой важной величиной является *время полупревращения* $t_{1/2}$ реакции, т. е. время, которое необходимо для того, чтобы концентрация реагирующего вещества уменьшилась вдвое по сравнению с исходным значением. Из уравнения (4.4), приняв $[A] = [A]_0/2$, получим

$$\ln \frac{[A]_0/2}{[A]_0} = -kt_{1/2}$$

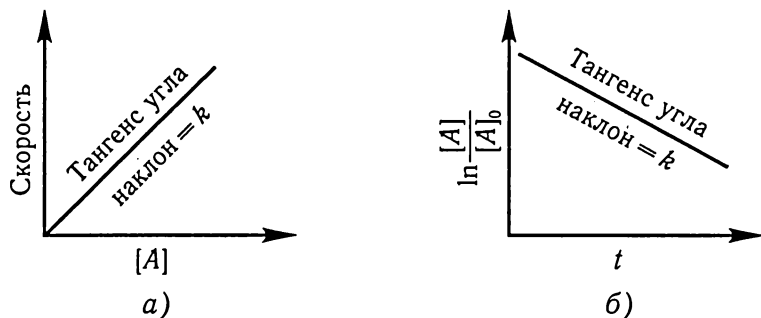


Рис. 4.2. Реакция первого порядка: а) — график зависимости скорости от концентрации реагирующего вещества; б) — график, основанный на уравнении 4.4

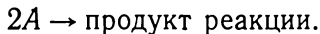
или

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}. \quad (4.5)$$

Время превращения реакции первого порядка не зависит от начальной концентрации вещества. Для уменьшения концентрации от 1 до 0,5 М потребуется ровно столько же времени, сколько для уменьшения концентрации от 0,001 до 0,0005 М.

К реакциям первого порядка относятся многие реакции радиоактивного распада.

3. Реакции второго порядка бывают двух типов. Первый из них можно выразить схемой:



Скорость этой реакции подчиняется уравнению

$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A]^2,$$

где $k(\text{M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1})$ — константа скорости реакции второго порядка.

Разделяя переменные и интегрируя, получим:

$$\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]^2} = \int_0^t k dt,$$

$$\frac{1}{[A]} - \frac{1}{[A]_0} = kt. \quad (4.6)$$

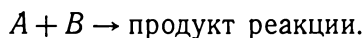
Время полупревращения для реакций второго порядка дается уравнением

$$\frac{1}{[A]_0/2} - \frac{1}{[A]_0} = kt_{1/2},$$

следовательно,

$$t_{1/2} = \frac{1}{k[A]_0}. \quad (4.7)$$

Другой тип реакций второго порядка, который встречается чаще, можно представить в виде



Пусть

$$[A] = [A]_0 - x,$$

$$[B] = [B]_0 - x,$$

где x — число молей A и B , израсходованных за время t . Тогда

$$-\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d([A]_0 - x)}{dt} = \frac{dx}{dt} = k[A][B] = k\{[A]_0 - x\}\{[B]_0 - x\}$$

После некоторых преобразований находим:

$$\frac{dx}{\{[A]_0 - x\}\{[B]_0 - x\}} = kdt.$$

Используя несколько громоздкий, но несложный метод интегрирования по частям, можно получить следующий окончательный результат:

$$\frac{1}{[B]_0 - [A]_0} \ln \frac{\{[B]_0 - x\}[A]_0}{\{[A]_0 - x\}[B]_0} = kd,$$

или

$$\frac{1}{[B]_0 - [A]_0} \ln \frac{[B][A]_0}{[A][B]_0} = kt. \quad (4.8)$$

График зависимости $\ln([B][A]_0/[A][B]_0)$ от t приведен на рис. 4.3.

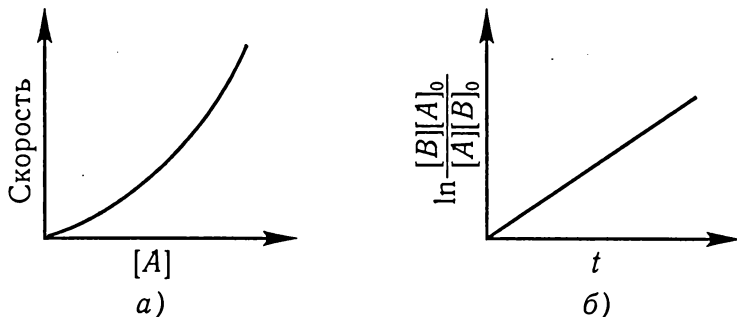


Рис. 4.3. Реакция второго порядка: а) — график зависимости скорости от концентрации реагирующего вещества для реакции $2A \rightarrow$ продукт реакции; б) — график, основанный на уравнении 4.8

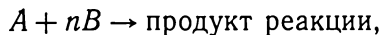
Таблица 4.1

Кинетические уравнения для реакции $A \rightarrow$ продукт реакции

Порядок	Дифференциальная форма	Интегральная форма	Время полупревращения	Единицы измерения константы скорости
0	$-\frac{d[A]}{dt} = k$	$[A]_0 - [A] = kt$	$\frac{[A]_0}{2k}$	М/с
1	$-\frac{d[A]}{dt} = k[A]$	$[A] = [A]_0 e^{-kt}$	$\frac{\ln 2}{k}$	с ⁻¹
2	$-\frac{d[A]}{dt} = k[A]^2$	$\frac{1}{[A]} - \frac{1}{[A]_0} = kt$	$\frac{1}{[A]_0 k}$	М ⁻¹ с ⁻¹
2 ^a	$-\frac{d[A]}{dt} = k[A][B]$	$\frac{1}{[B]_0[A]_0} \ln \frac{[A]_0[B]}{[A][B]_0} = kt$	—	М ⁻¹ с ⁻¹

^a — Реакции типа $A + B \rightarrow$ продукты реакции

Если стехиометрия реакции такова:



где n — число молей B , расходуемых при реакции с одним мо-
лем A , то

$$\frac{1}{[B]_0 - n[A]_0} \ln \frac{\{[B]_0 - nx\}[A]_0}{\{[A]_0 - x\}[B]_0} = kt. \quad (4.9)$$

Реакции второго порядка — самый распространенный тип реакций.

Исходя из вышеизложенного, можно обобщить наиболее распространенные типы реакций (табл. 4.1).

4.2. КИНЕТИКА РЕАКЦИЙ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ ФЕРМЕНТАМИ

Уже в самых ранних исследованиях по влиянию концентрации реагента на скорость ферментативных реакций была обнаружена очень важная особенность ферментативного катализа, которая состоит в сложном характере кинетики этих реакций. При низких концентрациях реагента (в энзимологии реагент называют субстратом) реакция протекает в соответствии с уравнением первого порядка, однако при высоких концентрациях субстрата скорость перестает зависеть от концентрации, и, таким образом, реакция в этих условиях протекает в соответствии с уравнением нулевого порядка [22—24].

Анри — один из первых исследователей в области ферментативной кинетики — предположил, что фермент образует промежуточное соединение или комплекс с субстратом. При высоких концентрациях субстрата весь фермент будет вступать в комплекс фермент—субстрат и скорость реакции будет достигать

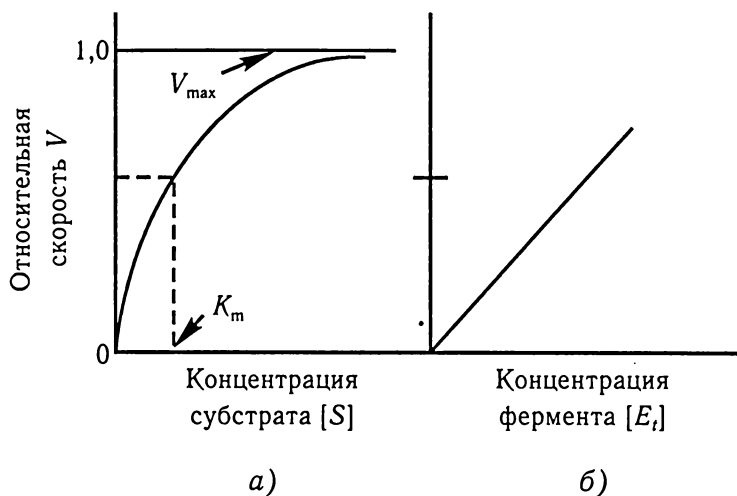


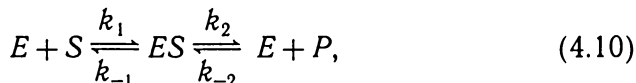
Рис. 4.4. Относительная начальная скорость как функция концентрации субстрата (а) и как функция концентрации фермента (б). Принято, что $V_{\max} = 1,0$; концентрация субстрата, при которой скорость равна $1/2V_{\max}$, численно равна K_m . В отличие от гиперболической зависимости V от $[S]$ зависимость V от $[E]$ линейна

максимума. Другими словами, в реакциях, катализируемых ферментами, стадия распада комплекса фермент—субстрат является стадией, лимитирующей скорость процесса.

Скорость всех ферментативных реакций зависит (при прочих постоянных условиях) не только от концентрации субстрата, но и от концентрации фермента (рис. 4.4).

В то время как при увеличении концентрации фермента скорость реакции увеличивается линейно, по мере возрастания концентрации субстрата (при постоянной концентрации фермента) она увеличивается гиперболически, достигая предельной максимальной скорости. Это указывает на то, что фермент должен иметь конечное число участков, взаимодействующих с субстратом; после заполнения всех участков дальнейшего увеличения скорости не происходит, и фермент оказывается насыщенным субстратом. Михаэлис и Ментен в 1913 г. одними из первых проанализировали кинетику ферментативного процесса

и вывели общее уравнение скорости (известное в настоящее время как уравнение Михаэлиса—Ментен) для реакции, в которой происходит обратимое взаимопревращение одного субстрата и одного продукта. Они предположили, что фермент E взаимодействует с субстратом S , образуя фермент — субстратный комплекс ES , из которого освобождаются фермент и продукт P :



где k_1 , k_{-1} , k_2 , k_{-2} — константы скорости соответствующих стадий реакции. Это важное уравнение выведено здесь с учетом допущения Михаэлиса и Ментен о том, что происходит образование комплекса ES , а также некоторых дополнительных допущений, которые были введены позднее.

Принято, что концентрация субстрата S намного больше, чем концентрация фермента E ; в рассмотрение включены только *начальные скорости*, т. е. скорости, определенные в условиях, когда только очень небольшая доля S превращается в P . В этом случае из P практически не образуется ES и стадией $E + P \rightarrow ES$ можно пренебречь. Общая концентрация фермента в $[E_t]$ системе

$$[E_t] = [E] + [ES], \quad (4.11)$$

где $[E]$ — концентрация свободного фермента, $[ES]$ — концентрация комплекса ES . Скорость реакции V равна:

$$V = k_2[ES]. \quad (4.12)$$

Это, по существу, уравнение скорости, однако им нельзя воспользоваться для расчетов, поскольку ни k_2 , ни $[ES]$ не могут быть измерены непосредственно. *Максимальная скорость* V_{\max} равна:

$$V_{\max} = k_2[E_t]. \quad (4.13)$$

Ее можно определить, поскольку V_{\max} не может превышать той скорости, которая наблюдается при полном насыщении фермента субстратом. Наконец, принимается допущение, что реакция протекает в *стационарных условиях*, т. е. скорость изменения $[ES]$ равна нулю ($d[ES]/dt = 0$) и, следовательно, $[ES]$ не изменяется в течение времени, необходимого для измерения скорости.

Скорость v_f образования комплекса ES пропорциональна $[E]$ и $[S]$, как в любой реакции второго порядка:

$$v_f = k_1[E][S] = k_1([E_t] - [ES])[S]. \quad (4.14)$$

Скорость v_d распада комплекса ES равна:

$$v_d = k_{-1}[ES] + k_2[ES] = (k_{-1} + k_2)[ES]. \quad (4.15)$$

Поскольку в стационарном состоянии $d[ES]/dt = 0$, то $v_f = v_d$; следовательно,

$$k_1([E_t] - [ES])[S] = (k_{-1} + k_2)[ES]. \quad (4.16)$$

Преобразуя уравнение (4.16), получаем:

$$\frac{[S]([E_t] - [ES])}{[ES]} = \frac{k_{-1}k_2}{k_1} = K_m, \quad (4.17)$$

где K_m (включающая все три константы скорости) называется *константой Михаэлиса*; это весьма важный параметр, характеризующий каждую пару фермент—субстрат.

Преобразуя уравнение 4.17, получаем выражение для $[ES]$:

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{K_m + [S]}. \quad (4.18)$$

Подставляя в уравнение 4.18 V вместо $k_2[ES]$ (из уравнения 4.12) и V_{\max} вместо $k_2[E_t]$, получаем окончательное выражение *уравнения Михаэлиса—Ментен*:

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}. \quad (4.19)$$

Рассмотрим теперь методы определения V_{\max} и K_m по результатам измерения V при различных концентрациях $[S]$. По гиперболической кривой, приведенной на рис. 4.4 можно определить K_m , однако нельзя определить с необходимой точностью V_{\max} , поскольку в эксперименте часто не удастся достичь концентрации субстрата, достаточной для насыщения фермента.

Используя, однако, выражение, обратное уравнению 4.19, получаем следующее линейное уравнение, называемое *уравнением Лайнуивера—Бэрка*:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}. \quad (4.20)$$

График зависимости $1/V$ от $1/[S]$, приведенный на рис. 4.5, представляет собой прямую с наклоном K_m/V_{\max} , отсекающую на оси ординат отрезок $1/V_{\max}$. Поскольку на графике легко измерить угол наклона и отрезок на оси ординат, то можно достаточно точно определить V_{\max} и K_m . Можно также умножить обе части уравнения 4.20 на $[S]$, тогда

$$\frac{[S]}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{[S]}{V_{\max}}. \quad (4.21)$$

После умножения обеих частей уравнения 4.20 на V_{\max} и соответствующих преобразований получим:

$$V = -K_m \frac{V}{[S]} + V_{\max}. \quad (4.22)$$

Графики уравнений 4.21 и 4.22 также представляют собой прямые; их можно использовать для определения V_{\max} и K_m , как показано на рис. 4.5.

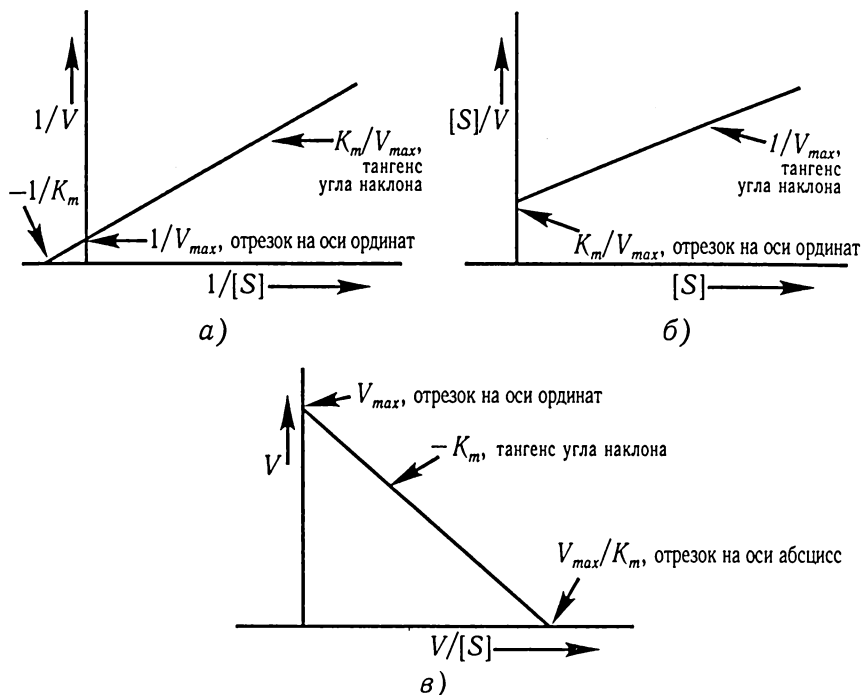


Рис. 4.5. Зависимости, используемые для определения K_m и V_{max} ферментативных реакций. Для нескольких концентраций субстрата вычисляют скорости, строят соответствующие зависимости. По наклонам прямых и отрезкам, отсекаемым на осях, находят K_m и V_{max} . Зависимости построены согласно: а) — уравнению 4.20; б) — уравнению 4.21; в) — уравнению 4.22

Порядок ферментативной реакции может изменяться во времени. Для обсуждения этого вопроса следует воспользоваться кривой Михаэлиса—Ментен (рис. 4.4). Рассмотрим соотношения, получаемые из уравнения 4.18 для высоких и низких концентраций субстрата, поскольку именно такие условия для начала и завершения катализируемых ферментами реакций. Если $[S]$ много больше K_m , т. е. концентрация субстрата очень высока, то

$$-\frac{d[S]}{dt} = V = V_{max} = k_2[E_t]. \quad (4.23)$$

Скорость реакции постоянна (при данной концентрации фермента). В этих условиях фермент насыщен субстратом и реакция протекает с максимальной скоростью, т. е. дальнейшее увеличение $[S]$ не изменяет скорости.

При снижении концентрации субстрата до значений, значительно меньших K_m (нижняя часть кривой на рис 4.4), видно, что

$$-\frac{d[S]}{dt} = V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m} = \frac{k_2[E_t][S]}{K_m}, \quad (4.24)$$

т. е. скорость реакции прямо пропорциональна концентрации субстрата.

Как правило, для характеристики каждого фермента определяют его *константу Михаэлиса*, которая легко воспроизводится и не зависит от концентрации фермента. Физический смысл этой константы заключается в том, что она численно равна концентрации субстрата, при которой активность фермента составляет половину максимальной. С помощью небольшого алгебраического преобразования мы можем четко показать это в математической форме, следующим уравнением, полученным путем деления уравнения 4.19, относительно K_m :

$$K_m = [S] \left(\frac{V_{\max}}{V} - 1 \right).$$

При такой концентрации $[S]$, когда $V = 1/2 V_{\max}$, уравнение 4.20 преобразуется в следующее:

$$K_m = [S].$$

K_m и $[S]$ всегда выражаются в одинаковых единицах — моль/л. Раньше особое значение придавали связи между K_m и родством фермента к одному или нескольким субстратам. Считалось, что субстрат, имеющий более низкую величину K_m , служит природным субстратом фермента, или что фермент обладает к нему наибольшим родством. В настоящее время

полагают, что определять на этом основании, какой из субстратов является природным или предпочитается ферментом, довольно необдуманно. Более того, рассматривать K_m как величину, характеризующую сродство фермента к субстрату, можно только при условии, если доказано, что K_m действительно является константой диссоциации $[ES]$, т. е. $K_m = k_{-1}/k_1$. Если же K_m равна $(k_{-1} + k_2)/k_1$, (т. е. константе стационарного состояния), или k_2/k_1 (в системе, где $[ES]$ не диссоциирует с образованием E и S), или какой-нибудь другой сложной функции, то тогда нельзя так просто интерпретировать изменение K_m для разных субстратов.

Фундаментальное значение величины V_{\max} связано с ее отношением к величине k_2 . Для специального случая, когда весь фермент входит в комплекс ES , мы можем заменить величину $k_2[E_t]$ на V_{\max} :

$$\text{Скорость} = k_2[ES] = \text{Максимум, т. е. } V_{\max}.$$

Если концентрация фермента выражена в моль/л, а скорость превращения субстрата — в моль/(л·мин), то k_2 равна максимальному числу оборотов фермента:

$$k_2 = \text{Число оборотов} = \frac{\text{Число молей субстрата, превращенных за 1 мин.}}{\text{Число молей фермента}}.$$

Поскольку скорость реакции зависит от температуры, число оборотов относят к какой-то конкретной температуре. Для того, чтобы определить число оборотов, необходимо знать молекулярную массу фермента, а также его молярную концентрацию в растворе.

4.2.1. ИНГИБИРОВАНИЕ, АКТИВАЦИЯ И ИНДУКЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

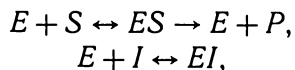
В зависимости от определяемых условий скорость реакций может изменяться. Для нас представляют интерес лекарственные средства, которые могут быть ингибиторами, активаторами

или индукторами ферментных систем. В этом случае ферменты представляют собой биологическую мишень действия лекарств. В то же время они являются катализаторами в реакциях метаболического превращения лекарственных средств, а в некоторых случаях и сами являются лекарствами (Глава 5). Более того, ферменты наряду с транспортными белками являются источниками нелинейности в фармакокинетических исследованиях. Следовательно, при взаимодействии лекарств с ферментами они могут быть и лигандами, и субстратами.

В ходе изучения ингибиторов была получена ценная информация относительно таких вопросов, как субстратная специфичность ферментов, природа функциональных групп, составляющих активный центр, механизм действия фермента и участие определенных функциональных групп в поддержании специфической конформации молекулы фермента. Особое значение имеет тот факт, что ингибирование различных ферментов специфическими клеточными компонентами служит одним из факторов, регулирующих ход ферментативных реакций в интактной клетке.

Различают прежде всего *обратимое* и *необратимое* ингибирование. Необратимое ингибирование обычно сопровождается разрушением или модификацией одной или нескольких функциональных групп фермента (ниже приведены примеры). Обратимое ингибирование может быть предметом количественного изучения с использованием уравнения Михаэлиса—Ментен. Оно, в свою очередь, подразделяется на два типа: *конкурентное* и *неконкурентное*. Конкурентное ингибирование может быть ослаблено или устранено путем увеличения концентрации субстрата. На неконкурентное ингибирование изменение концентрации субстрата не влияет.

В случае конкурентного ингибирования субстрат [S] и ингибитор [I] конкурируют за один и тот же активный центр. Реакции описываются следующими уравнениями:



где комплекс EI не способен давать продукты реакции. Такую систему можно снова рассматривать в рамках модели Михаэлиса—Ментен. В стационарном приближении для ES получим

$$v_0 = \frac{V_m}{1 + (K_m/[S])[1 + ([I]/K_I)]}, \quad (4.25)$$

где

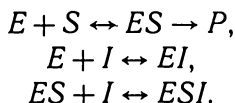
$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}.$$

В координатах Лайнуивера—Берка находим уравнение

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}. \quad (4.26)$$

Таким образом, строя зависимость $1/v_0$ от $1/[S]$ при постоянной концентрации I , получим прямую линию (рис. 4.6, *a*). Отличие уравнения 4.26 от уравнения 4.20 состоит в том, что тангенс угла наклона при наличии ингибитора, увеличивается в $(1 + [I]/K)$ раз. Точка пересечения с осью $1/v_0$ для обоих графиков совпадает.

Неконкурентный ингибитор обычно не связывается с активным центром фермента. Происходящие при неконкурентном ингибировании реакции можно выразить следующей схемой:



Ни EI , ни ESI не образуют продуктов реакции. Поскольку I не мешает образованию ES , неконкурентное ингибирование нельзя устранить путем повышения концентрации субстрата. Начальная скорость реакции равна

$$v_0 = \frac{V_m[S]}{(K_m + [S])[1 + ([I]/K_I)]}. \quad (4.27)$$

График в координатах Лайнуивера—Берка строится по уравнению

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right). \quad (4.28)$$

Из рис. 4.6, б видно, что зависимость $1/v_0$ от $1/[S]$ выражается прямой линией.

Этот результат подтверждает предположение, что степень неконкурентного ингибирования не зависит от $[S]$ и определяется только $[I]$ и K_I .

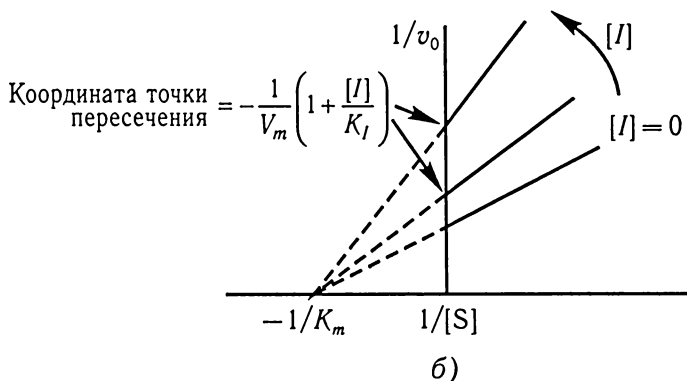
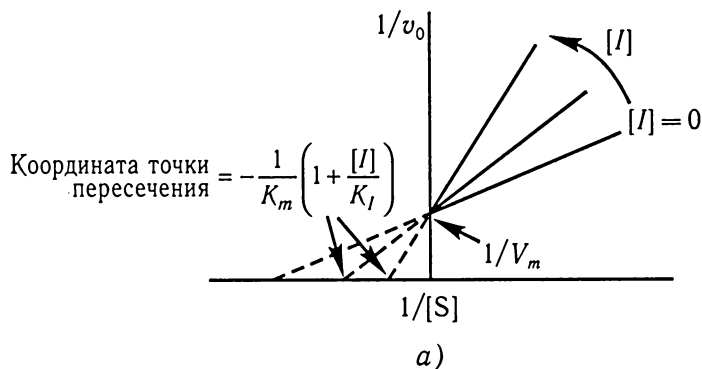
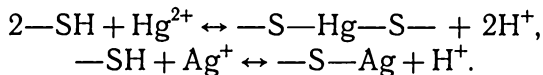


Рис. 4.6. Графики в координатах Лайнуивера—Берка: а) — в присутствии конкурентного ингибитора; б) — в присутствии неконкурентного ингибитора

Примерами неконкурентного ингибирования служат обратимые реакции между сульфгидридными группами остатков цистеина с ионами тяжелых металлов:



Модель Межаэлиса—Ментен неприменима к необратимым реакциям. Ингибитор образует ковалентную связь с ферментом и не может быть удален диализом или другими аналогичными методами. Эффективность необратимого ингибитора не определяется константой равновесия, а зависит от скорости связывания. В качестве необратимых ингибиторов можно назвать йодацетамиды и малеимиды, которые необратимо реагируют с сульфгидрильными группами.

Наряду с ингибиторами существует целый ряд активаторов ферментов. Хорошим примером такого активатора может быть цистеин, который содержит свободную —SH группу.

Особенно важным и повсеместно распространенным в природе активатором многих ферментов, также содержащим свободную сульфгидрильную группу, является восстановленный глутатион. Активирующее действие цистеина и глутатиона заключается в том, что они восстанавливают дисульфидные связи фермента с образованием —SH групп, необходимых для проявления его каталитической активности.

Концентрация фермента в клетке определяется соотношением скоростей его синтеза и распада.

Ферменты, которые всегда присутствуют в клетке в более или менее постоянных количествах, называются *конститутивными ферментами*. В отличие от них так называемые адаптивные, или *индуцибельные ферменты* синтезируются только в ответ на появление в среде соответствующего субстрата. Гены, контролирующие синтез адаптивных ферментов, обычно находятся в состоянии репрессии и вводятся в действие, т. е. дерепрессируются, только в ответ на присутствие индуктора. В некоторых случаях может иметь место репрессия или индукция

одновременно целой группы ферментов; это связано с тем, что синтез всей этой группы ферментов закодирован в ДНК набором последовательно расположенных генов, который носит название оперона.

Индукция ферментов приводит к так называемой метаболической толерантности лекарств.

В заключение приведем еще некоторые сведения о природе ферментативной активности, которые будут полезны в наших дальнейших рассуждениях.

Исследования ферментативных реакций свидетельствуют о том, что ферменты представляют собой катализаторы в обычном смысле этого слова, и, следовательно, что увеличение скорости ферментативного процесса связано с понижением энергии активации той реакции, которая вызывает превращение субстрата в конечный продукт. Однако ферменты отличаются от обычных катализаторов необычайно высокой специфичностью и эффективностью своего действия. Хотя некоторые катализаторы, используемые в неорганическом катализе, также обладают достаточно высокой специфичностью, специфичность ферментов настолько превосходит их, что оказывается величиной совсем иного порядка. Это приводит нас к выводу, что ферментные белки являются катализаторами особого типа. Высокая скорость ферментативных реакций и часто наблюдаемые при этих реакциях конформационные изменения молекул фермента также убеждают нас в том, что белковый катализатор в большей степени вовлекается в реакцию, чем это происходит в различных случаях неорганического катализа.

Совершенно очевидно, что в процессе катализа молекула фермента образует комплекс с молекулой субстрата. В настоящее время имеются убедительные доводы в пользу того, что он по своей природе аналогичен комплексу, образующемуся при любой химической реакции, и что в его формировании участвуют ковалентные и водородные связи, а также связи, обусловленные вандерваальсовыми силами между реагирующими молекулами. Специфичность действия фермента определяется

тем, что присоединение молекулы субстрата к ферменту происходит одновременно по многим точкам, что позволяет ему «различать» молекулы своего субстрата среди множества других, случайно сталкивающихся с ним молекул. Наблюдаемый вид каталитической реакции непосредственно зависит от характера связей, образующихся между молекулами фермента и субстрата; иными словами, характер этой реакции связан со «специфичностью» образующегося фермент-субстратного комплекса. Например, при действии эстераз, расщепляющих эфирную связь в соединениях типа $R-O-Q$, место расщепления зависит от того, в отношении какой «стороны» эфира специфичен данный фермент. Если специфичность к радикалу R выше, чем к радикалу Q , то будет расщепляться ближайшая к этому радикалу связь.

Рассматривая в данной главе процессы ферментативного катализа, мы предполагали, что превращение субстрата в конечный продукт обусловлено соответствующим изменением свободной энергии системы. Вместе с тем важно понимать, что фермент, являясь истинным катализатором, увеличивает скорости как прямой, так и обратной реакций, т. е. что эти реакции являются полностью обратимыми. Можно показать при соответствующих концентрациях субстрата (или конечного продукта) и достаточно продолжительном времени наблюдения, что фермент способен катализировать реакцию в обоих направлениях. В связи с этим важно отдавать себе отчет в том, что фермент образует комплекс с конечным продуктом реакции EP , который затем распадается на $E + S$. В некоторых условиях протекание обратной реакции может изменять кинетику исследуемого ферментативного процесса; только в том случае, когда измеряются начальные скорости реакции, можно игнорировать величину k_4 и взаимодействие между молекулами фермента и конечного продукта.

4.3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИНТЕРПРЕТАЦИИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ В РАМКАХ ПРИНЦИПОВ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Рассматривая фундаментальные законы физической химии и их применение в отдельных звеньях системы LANDMER фармакологических исследований (Главы 1—4) мы некоторые обсуждения термодинамики (свободная энергия и энтропия) проводили в абстрактной форме, без надлежащей связи с другими процессами (Главы 2—4). Для более полного понимания смысла этих понятий необходимо интерпретировать их на молекулярном уровне. Современная физическая химия, в основном в связи с развитием квантовой и статистической механики, предоставляет возможным сделать также и обобщающие заключения [7].

Известно, что молекула (или электрон в атоме) в каждый данный момент времени может находиться на каком-либо определенном дискретном энергетическом уровне. Энергия молекул не может изменяться непрерывно. Кроме того, необходимо понять, какое распределение молекул по отдельным энергетическим состояниям соответствует некоторому среднему (макроскопическому) значению параметров, характеризующих всю популяцию молекул в целом. Для определения наиболее вероятных энергетических состояний молекул можно применить разнообразные критерии. Их использование поможет нам предсказать наиболее вероятные состояния, в которых будет находиться большая часть молекул.

При игре в кости число семь выпадает чаще, чем любое другое, потому что оно образуется в результате наибольшего числа произвольных комбинаций других чисел. Совершенно по тем же соображениям число молекул, находящихся в каком-то данном состоянии, будет зависеть от количества энергетических уровней, отвечающих данной конфигурации и доступных для молекул. Будут преобладать конфигурации, соответствующие

максимальному числу энергетических уровней. Те же конфигурации, которым соответствует минимальное число уровней, будут присутствовать в относительно небольшом количестве, хотя бы просто потому, что имеется определенная конечная вероятность для заполнения молекулами каждого доступного для них состояния. Таково общепринятое толкование, позволяющее с позиций статистической физики объяснить распределение молекул по различным состояниям (изомерным формам). Преобладающей будет та форма, которой (в данном диапазоне энергий) соответствует наибольшее число доступных энергетических уровней. Иными словами, поскольку вся энергия системы распределится между всеми ее молекулами случайным образом, молекулы займут все доступные им энергетические состояния. В этих условиях наиболее вероятными будут те конфигурации молекул, которым соответствует наибольшее число энергетических уровней. В то же время в равной мере очевидно, что молекулы, занявшие нижние энергетические уровни, будут находиться в наиболее благоприятном положении, поскольку система в целом стремится перейти в наиболее низкое возможное для нее энергетическое состояние. Поэтому характер распределения энергии в популяции молекул будет определяться действием двух противоположно направленных тенденций: случайным распределением молекул по энергетическим уровням и постепенной миграцией индивидуальных молекул в наиболее низкое, еще доступное для них энергетическое состояние. Если мы хотим использовать понятие «изменение свободной энергии», для точного определения наиболее вероятного состояния молекул, то необходимо выявить вклад обоих этих процессов в величину ΔG .

Энтальпия (H) связана с внутренней энергией системы. Поэтому в том случае, когда значение ΔH отрицательно, следует ожидать, что изменение свободной энергии также будет отрицательным. Мы можем сказать, таким образом, что по мере уменьшения свободной энергии вероятность нахождения молекул на низких энергетических уровнях становится больше.

В то же время мы знаем, что имеется еще один фактор, который определяет распределение молекул по отдельным энергетическим уровням. В определенном смысле он соответствует числу доступных для системы энергетических уровней, т. е. мерой вероятности обнаружения молекулы в каком-то данном энергетическом состоянии. Потому выражение для изменения свободной энергии должно быть записано в следующем виде: $\Delta G =$ (изменение нижнего энергетического уровня системы) — изменение характера распределения молекул по энергетическим уровням).

Соображения, рассмотренные выше, позволяют интерпретировать понятие энтропии на молекулярном уровне. Чем больше состояний в каждой данной энергетической области доступно для системы, тем выше ее энтропия. Эта способность к переходу систем в неупорядоченное состояние проявляется обычно с достаточной отчетливостью. При увеличении «беспорядка» в системе ее энтропия сильно возрастает, а величина свободной энергии значительно уменьшается. Поэтому мы можем утверждать, что любая система в течение времени будет спонтанно переходить в менее упорядоченное состояние. В результате прохождения этого процесса способность системы к совершению работы (в будущем) значительно уменьшится. В сущности, величина энтропии системы определяет как раз ту часть ее внутренней энергии, которая не может быть превращена в работу. С увеличением энтропии системы (уменьшением ее упорядоченности) становится все более трудным создать условия для дальнейшего уменьшения свободной энергии (т. е. получения полезной работы).

Несмотря на большую познавательную и практическую ценность физического содержания процесса изменения свободной энергии оно представляет собой небольшую ценность для фармаколога. Основная цель фармаколога — извлечь полезную информацию из данных изменения свободной энергии, происходящей при протекании соответствующих реакций.

Для этого были выведены уравнения, устанавливающие связь между данной величиной и некоторыми другими величинами,

которые с относительной легкостью могут быть определены в лабораторных условиях. Одним из наиболее важных соотношений является уравнение, устанавливающее связь между величиной свободной энергии и константой равновесия:

$$-\Delta G^0 + \Delta G = RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} - RT \ln \frac{[C_0][D_0]}{[A_0][B_0]}, \quad (4.29)$$

где ΔG^0 — изменение стандартной свободной энергии, а ΔG — изменение свободной энергии, соответствующей всем иным условиям. (ΔG^0 представляет собой разность свободной энергии чистых реагентов и чистых продуктов, измеренную при стандартных условиях). В положении равновесия ΔG равно нулю, и, таким образом, выражение 4.29 можно представить в следующем виде:

$$-\Delta G^0 = RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} - RT \ln \frac{[C_0][D_0]}{[A_0][B_0]}.$$

Поскольку в стандартных условиях концентрации всех реагентов и продуктов равны 1 М, то последний член уравнения равен $\ln 1$ и все выражение упрощается, принимая вид:

$$\Delta G^0 = -RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]},$$

или

$$\Delta G = -RT \ln K. \quad (4.30)$$

Выражение 4.30 подтверждает наши интуитивные представления о том, что положение равновесия реакции определяется различиями свободных энергий реагентов и продуктов.

Выражение 4.30 обычно используют для определения изменения стандартной свободной энергии реакции. Если константа равновесия известна, то используют соотношение

$$\Delta G^0 = -4,6 \lg K.$$

К сожалению, величина ΔG^0 не столь полезна для биологических расчетов, как ΔG . Поскольку соотношение 4.30 описывает состояние равновесия, то $\Delta G = 0$. Для всех других состояний оно имеет вид:

$$\Delta G^0 - \Delta G = -RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]},$$

где концентрации веществ не соответствуют их концентрациям в состоянии равновесия, или

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]}. \quad (4.31)$$

Распределение ионов по обе стороны полупроницаемой мембраны представляет собой еще один интересный и важный в биологическом смысле пример, имеющий значение и в фармакологии (каналопатии, блокаторы каналов). Его можно рассмотреть с помощью термодинамических методов. Для этого представим себе, что первоначально в отсеке В содержатся ионы Na^+ и Cl^- , а в отсеке А ионы Na^+ и P^- (белок).

В этих условиях ионы Na^+ и ионы Cl^- будут диффундировать через мембрану, чтобы установилось положение равновесия. Хотя ион Cl^- свободно проникает через мембрану, ионы белка (P^-) не могут проникнуть через нее. Следовательно, наблюдаемое в этих условиях равновесное состояние существенно отличается от того, которое создалось бы в том случае, если бы белок мог свободно диффундировать через мембрану. Наступающее равновесие обычно называется равновесием Гиббса—Донанна (*доннановским равновесием*). Оно описывается уравнением, согласно которому произведение концентраций способных к диффузии ионов по одну сторону мембраны должно равняться произведению их концентраций по другую ее сторону:

$$[\text{Na}^+]_A [\text{Cl}^-]_A = [\text{Na}^+]_B [\text{Cl}^-]_B.$$

Условие равновесия должно согласовываться с термодинамическим анализом процесса, проведенным исходя из существования связи между изменением свободной энергии и относительными концентрациями отдельных компонентов системы. Движение ионов из B в A можно рассматривать как процесс их разведения. Свободная энергия Na^+ по обе стороны мембраны будет при этом определяться следующим соотношением:

$$\begin{aligned} G_A &= G^0 + RT \ln[\text{Na}^+]_A, \\ G_B &= G^0 + RT \ln[\text{Na}^+]_B, \\ \Delta G_{AB} &= RT \ln[\text{Na}^+]_A - RT \ln[\text{Na}^+]_B, \end{aligned}$$

или

$$\Delta G_{\text{Na}^+} = RT \ln \frac{[\text{Na}^+]_A}{[\text{Na}^+]_B}.$$

Подобным же образом соотношение, описывающее свободную энергию ионов Cl^- , будет выглядеть следующим образом:

$$\Delta G_{\text{Cl}^-} = RT \ln \frac{[\text{Cl}^-]_A}{[\text{Cl}^-]_B}.$$

Однако в состоянии равновесия, которое мы пытаемся определить, суммарное изменение свободной энергии должно быть равно нулю, поскольку в этих условиях не может быть совершена полезная работа. Поэтому мы можем записать следующее равенство:

$$RT \ln \frac{[\text{Cl}^-]_A}{[\text{Cl}^-]_B} + RT \ln \frac{[\text{Na}^+]_A}{[\text{Na}^+]_B} = 0,$$

что после простых алгебраических преобразований даст выражение

$$[\text{Na}^+]_A [\text{Cl}^-]_A = [\text{Na}^+]_B [\text{Cl}^-]_B.$$

Таким образом, равновесие Гиббса—Доннана представляет собой такое состояние, при котором произведение концентраций способных к диффузии ионов, которые расположены по обе стороны мембраны, равны между собой. Условия, соответствующие равновесию, могут быть определены путем термодинамического рассмотрения этой системы.

В рассмотренной системе через мембраны перемещаются ионы Cl^- и вместе с ними перемещается равное количество ионов Na^+ , (чтобы предотвратить разделение зарядов). Поскольку ионы белка неспособны к диффузии, часть ионов натрия останется связанной с белком на стороне *A*, и поэтому даже тогда, когда будет достигнуто состояние равновесия, количество ионов Na^+ на этой стороне окажется избыточным. Иными словами, если рассматривать только способные к диффузии ионы, то на стороне *A* будет наблюдаться избыточное количество ионов Na^+ (по сравнению с ионами Cl^-), в то время как концентрация ионов Na^+ и Cl^- на стороне *B* должна быть равна. По этим же соображениям общее количество (сумма) ионов на стороне *A* не будет равна соответствующей величине, определенной для *B*. Можно видеть далее, что избыток ионов Na^+ на стороне *A* будет компенсирован соответствующим увеличением количества ионов Cl^- на стороне *B*. (Иначе произведения концентраций ионов не будут равны). Следовательно, в состоянии равновесия распределение способных к диффузии ионов по обе стороны полупроницаемой мембраны окажется асимметричным.

В предыдущих главах нами давалась характеристика термодинамически обратимым и химически обратимым системам. Следует отметить наличие существенных различий между этими понятиями.

Мы имеем право утверждать, что реакция типа $A + B \leftrightarrow C + D$ химически обратима, ибо в зависимости от условий проведения реакции ее продуктами могут быть вещества $C + D$ или $A + B$. Термодинамически обратимым является значительно более узкий круг процессов. При обратимом термодинамическом процессе

система должна вернуться точно в то же самое состояние, в котором она находилась первоначально. Следовательно, при этом необходимо, чтобы в изолированной системе не происходило изменений энтропии или чтобы изменение энтропии в закрытой системе было компенсировано соответствующим изменением энтропии окружающей среды.

В биологии по большей части мы имеем дело с термодинамически необратимыми системами. К сожалению, уравнения, служащие для описания термодинамически необратимых процессов, довольно сложны и их рассмотрение выходит за пределы данной книги. Однако законы классической термодинамики, давая лишь приближенное описание процессов, позволяют, как правило, понять существо изучаемого явления, хотя некоторые его детали остаются при этом нераскрытыми. Для целей дальнейшего изложения важно учитывать, что, большинство биологически важных реакций химически обратимы, они не являются обратимыми (равновесными) термодинамическими процессами.

ВЫСВОБОЖДЕНИЕ СУБСТАНЦИИ ИЗ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ

В системе LADMER стадия высвобождения фармакологического вещества из определенной лекарственной формы (*L* — liberation) является несколько узким термином по отношению к тому, какие вопросы рассматриваются в этой главе. Его границы довольно широкие и их можно характеризовать как оптимизацию свойств и состава лекарственной формы, определяющую скорость и интенсивность перехода субстанции из места введения в биофазу действия. Последнее, как видно из сказанного, относится и к процессам всасывания, что является объектом специального исследования (*A* — absorption).

Невозможно провести четкого раздела между стадиями *L* и *A*, однако каждой из них присущи свои особенности и приоритеты. Так при изучении процессов, происходящих в стадии *L*, основное внимание уделяется распадаемости и растворению твердых лекарственных средств (таблеток), в опытах *in vitro* и *in vivo*, а также установления степени и скорости всасывания активного ингредиента в опытах на целостном организме (биодоступность).

Что касается стадии *A*, то в ней анализируются закономерности зависимостей между физико-химическими свойствами биологически активных соединений и скоростями их всасывания. Определяются механизмы и пути транспорта лекарств в организме, а также роль физиологических факторов, регулирующих эти процессы (Глава 6).

Необходимость включения в стадию *L* ряда показателей из стадии *A* очевидна. Еще сравнительно недавно представлялось бесспорным, что введение лекарственного средства пациенту одним и тем же путем в одной и той же дозе производит одинаковый

терапевтический эффект. Тем не менее, в связи с развитием фармацевтической индустрии на рынке появилось большое число препаратов, идентичных по химическому строению действующего начала, но подчас весьма различных по соответствующему эффекту. Анализ фармакокинетики некоторых из этих лекарственных форм показал, что такие различия, как правило, обусловлены неодинаковыми уровнями содержания субстанции в крови, создающимися при их введении в эквивалентных дозах.

Установление причин, порождающих фармакокинетическую неэквивалентность лекарственных форм, содержащих одну и ту же субстанцию, показало, что она связана главным образом с его неодинаковым всасыванием, которое в свою очередь зависит и от физико-химических свойств биологически активного ингредиента. Эти обстоятельства стимулировали поиск оптимальных рецептур приготовления готовых форм лекарственных средств на основе изучения их поведения в опытах *in vivo*.

Однако применение препаратов, которые, по данным, полученным в опытах *in vivo*, характеризовались быстрым и полным высвобождением субстанции, нередко приводило к худшим терапевтическим результатам по сравнению с достигавшимися при использовании готовых форм с лучшими физико-химическими свойствами. В связи с этим возникла потребность в ином критерии оценки препарата. В качестве такого критерия можно было бы использовать фармакодинамические показатели. Однако, это оказалось возможным лишь для ограниченного числа лекарств и их эффектов, поскольку многие виды основного действия лекарственных средств не поддаются строгой количественной характеристике. Поэтому для оценки препаратов стали изучать фармакокинетику лекарственных средств. В большинстве случаев подобный подход — правомочен, так как наблюдается прямая корреляция между концентрацией лекарств в крови и интенсивностью их фармакологического эффекта.

Следовательно, классическое определение лекарственной формы как удобной для приема больными, рациональной с фармакокинетической точки зрения и обеспечивающей опти-

мальное терапевтическое действие, употребляется и в настоящее время.

Анализ имеющихся сведений о значении лекарственных форм и путях их введения в организм больного дает основание заключить, что рационально подобранные формы позволяют максимально использовать лечебное действие препаратов, при минимальных побочных эффектах, существенно изменить интенсивность действия субстанции, если надо ускорить или пролонгировать его, увеличить скорость всасывания и выведения, снизить аллергизирующее действие, при необходимости улучшить органолептические свойства препарата [25].

Существует несколько общепринятых классификаций лекарственных форм, в основу которых положены разные принципы: агрегатное состояние веществ, пути введения, способы применения и др. Нельзя не согласиться с авторами обзорной статьи [26], которые указывают, что наиболее адекватная современным требованиям классификация лекарственных форм должна базироваться на основе биофармацевтического анализа, учитывающего три основных фактора: физико-химические свойства лекарственных форм, особенности методов их изготовления и биологическую функцию (назначение).

Последнее обстоятельство имеет особо важное значение, так как успехи современной фармакотерапии связывают не только с созданием новых (оригинальных) лекарственных средств, но в большей степени с разработкой новых оптимальных лекарственных форм для уже существующих препаратов. Выбор оптимальной лекарственной формы и использование адекватного пути введения лекарства в организм пациента зачастую определяют клиническую эффективность лечения. Поэтому с медицинской, потребительской точки зрения распределение лекарственных форм по группам в зависимости от пути введения является предпочтительным. Тем более, что при современном уровне фармацевтической технологии несколько отступают на задний план привычные характеристики лекарственных форм: твердые, жидкие, мягкие и др.

Пути поступления (введения) лекарств определяют в организме место всасывания. Как правило, пользуются одним из следующих путей введения: энтеральным или букальным, ректальным, парентеральным, внутримышечным, подкожным, ингаляционным и трансдермальным. Отсюда особенности процессов всасывания и сопряженная с ними элиминация (рис. 5.1).

Наиболее распространенной лекарственной формой являются таблетки. Благодаря введению специальных компонентов (вспомогательных веществ) и применению технологических приемов, таблетки из традиционно оральных, растворяющихся

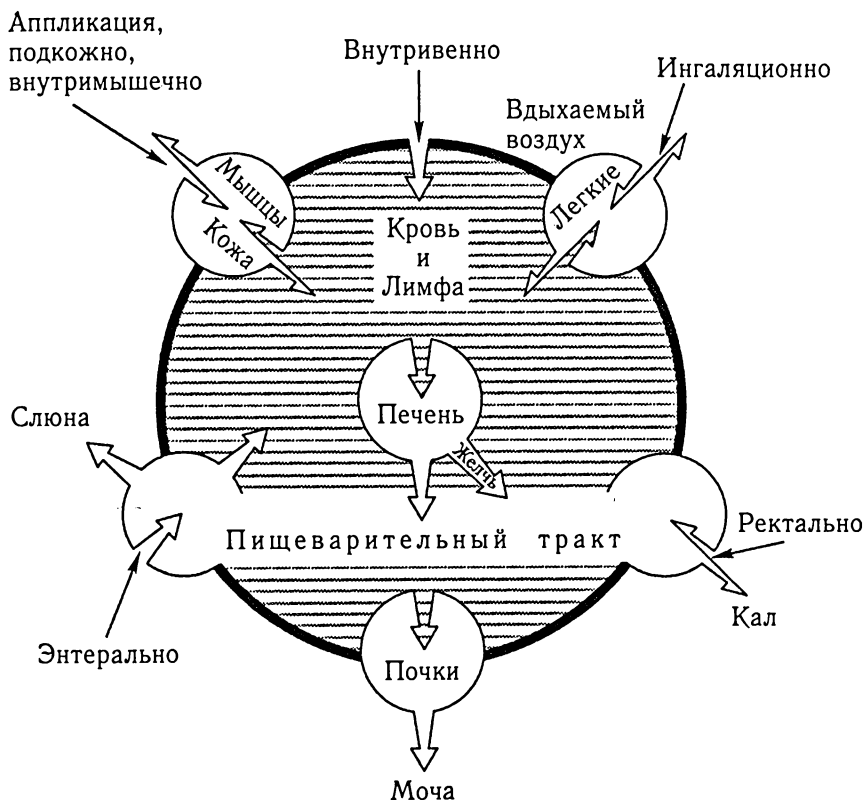


Рис. 5.1. Основные пути поступления и выведения из организма лекарственных средств

преимущественно в желудке, теперь могут быть кишечнорастворимыми, с быстрым или, наоборот, пролонгированным действием. Одним из последних достижений является создание многослойных таблеток с пульсирующим высвобождением лекарственного средства и с источником энергии, достаточным для последовательной доставки двух доз препарата и контролирующим элементом между слоями, который регулирует высвобождение второй фазы вещества. Такие таблетки относятся к системам доставки лекарственного средства.

По прогнозам зарубежных специалистов ожидается активное развитие работ в области систем доставки лекарственного вещества. Уже сейчас при их создании используются принципы взаимодействия компонентов в составе таблеток, покрытие частиц лекарственного соединения оболочкой, взаимодействие между частицами и различные сочетания этих подходов. Поэтому ожидается значительный прогресс в развитии фармацевтических систем доставки лекарственного средства в организм, обеспечивающих точность дозирования, безопасность, широкий спектр действия и удобство для пациента. В таких системах не просто регулируется высвобождение лекарства, но и может осуществляться программированное его распределение в соответствии с уровнем (концентрацией) препарата в плазме крови.

Таким образом, лекарственные средства редко представляют собой только биологически активное вещество. Обычно они являются сложной физико-химической системой, состоящей из субстанции и вспомогательных веществ, которая образует лекарственную форму. Как правило, эта система не является механической смесью. В процессе приготовления и последующего хранения в ней протекают физико-химические и химические процессы.

Практически все вспомогательные вещества проявляют прямую фармакодинамическую индифферентность. Однако в результате изменения фармакокинетических профилей активного ингредиента они могут регулировать его активность.

5.1. РАСПАДАЕМОСТЬ

Первым этапом в процессе высвобождения субстанции из фармацевтических таблеток является их распадаемость. Этот показатель не только важен в связи с определением качества лекарственной формы, но и с биофармацевтической точки зрения, так как характеризует вместе с другими показателями биодоступность препарата.

Распадаемость — это процесс, в котором происходит разрушение таблетки на небольшие фрагменты и частицы, формирующие обширную поверхность смеси субстанции и вспомогательных веществ для их дальнейшего растворения в биологических жидкостях [25]. Распадаемость и растворимость таблеток зависит от ряда факторов: физико-химических и физико-механических свойств компонентов таблеток, технологии производства, от величины давления и прессования.

Обычно выделяют четыре группы таблеток, которые отличаются друг от друга свойствами веществ, входящих в их состав, а отсюда способностью к распадаемости и растворимости [27]:

1. Набухающие с последующим распадением. Такие таблетки способны пропитываться водой, затем набухать и, наконец, распадаться.

2. Таблетки набухающие, но не распадающиеся. Распадаемость таких таблеток происходит путем постепенного отслаивания и растворения.

3. Распадающиеся с поверхности. Они состоят из растворимых веществ, где в качестве разбавителя используется сахар. В процессе растворения вокруг таблеток образуется концентрированный слой раствора, затрудняющий дальнейшее прохождение растворения, за счет уменьшения диффузии жидкости в таблетки.

4. Растворимые. К этой группе относят таблетки, в состав которых входят только легкорастворимые вещества. Растворимость

таких таблеток происходит за счет хорошей смачиваемости поверхности.

Существуют три гипотезы, объясняющие механизм распадаемости таблеток. В соответствии с первой из них, распадаемость можно объяснить набуханием, приводящим к разрушению целостности таблетки, разрыву ее на части. Вторая гипотеза предполагает разрушение таблетки под действием капиллярных сил. Третья объясняет распадаемость таблетки на части при увлажнении расширением воздуха в порах при выделении тепла адсорбции.

При массовой оценке качества таблеток или при многочисленных экспериментах по разработке технологии новых лекарственных форм используются разнообразные методы *in vitro*. Определение распадаемости таблеток по требованию большинства фармакопей производят при 37°C, однако, по данным литературы, температурный режим может колебаться от 20 до 40°C.

Время распадаемости должно быть указано в частных статьях. При отсутствии этих указаний таблетки должны распадаться в течение 15 мин. Таблетки покрытые оболочкой — не более 30 мин.

Кишечно-растворимые таблетки не должны распадаться в течение 1 часа в растворе хлористоводородной кислоты (0,1 моль/л) и после промывания водой должны распадаться в растворе гидрокарбоната натрия (рН 7,5—8,0) в течение не более 1 часа, если нет дополнительных указаний в соответствующей статье.

Распадаемость таблеток может регулироваться вспомогательными веществами — разрыхлителями (крахмал). В этом случае поведение крахмала обусловлено тем, что растворимые вещества при пропитке таблеток образуют вокруг поверхности и капиллярах малоподвижные пленки концентрированного раствора с высоким осмотическим давлением, что препятствует гидратации на зернах крахмала воды и образованию гидратной оболочки вокруг зерен. Она способствует эластическому

восстановлению деформированного при прессовании зерна и разрушению таблетки. При отсутствии такой оболочки крахмал не обладает разрыхляющим действием, а при очень высоком осмотическом давлении происходит желирование крахмала и закупорка пор в таблетках, что ухудшает распадаемость. Такой механизм объясняет высокую эффективность других ограничено набухающих веществ (*H*-карбоксиметилцеллюлозы, микрокристаллической целлюлозы).

Условия грануляции также оказывают большое влияние на распадаемость таблеток. Применение высоковязких гранулирующих жидкостей при прочих равных условиях приводит к увеличению времени распадаемости [27].

Распадаемость таблеток является одним из начальных этапов, лимитирующих степень и скорость всасывания лекарственных средств (Глава 6), а отсюда такого важнейшего показателя для фармацевтической продукции как биодоступность. Конечно, наиболее полные и достоверные данные о биологической доступности могут быть получены только в опытах, проведенных на целостном организме. Перенесение данных с опытов *in vitro* на *in vivo* не только бесполезное занятие, но временами и вредное. Так при исследовании в опытах *in vitro* семи генерических антигельминтных препаратов — празиквантела были получены очень близкие значения их распадаемости. Однако при установлении биодоступности этот показатель значительно отличал их друг от друга [28].

Если же используются для обеспечения распадаемости таблеток вещества — разрыхлители, то они, как в случае с различными формами сульфадимина, в опытах *in vitro* могут быть идентичными. Однако, в опытах *in vivo* [29] их фармакокинетические параметры — различны.

5.2. РАСТВОРЕНИЕ

В процессе распадаемости таблеток происходит постепенное, в зависимости от предназначения препарата, высвобождение субстанции с последующим ее растворением. Только в растворенном виде лекарственное вещество способно участвовать в тех многочисленных процессах, которые составляют основу ADME.

Испытание на растворение устанавливает величину скорости перехода субстанции из лекарственной формы в раствор в течение определенного времени. Скорость растворения характеризуется количеством вещества (в процентах дозы), перешедшего в растворитель:

$$\frac{dv}{dt} = kS(C - C_t) \frac{dv}{dt} = kS(C - C_t), \quad (5.1)$$

где dv/dt — скорость растворения; k — константа; S — общая поверхность растворяющегося вещества; C — растворимость вещества в растворителе; C_t — содержание вещества в растворителе через промежуток времени t .

Тест на скорость растворения является обязательным при подборе оптимального состава и параметров технологического процесса получения лекарственной формы, т. к. он дает возможность исключить те формы, которые не эквивалентны в терапевтическом отношении и сохранить качество выпускаемых лекарственных средств на постоянном уровне [27].

Для испытания на растворимость твердых лекарственных форм разработано многочисленное количество методов и приборов, обеспечивающих их. Однако, наиболее часто с этой целью используется прибор с вращающейся корзиной, с помощью которой определяют скорости растворения лекарственных средств многие фармакопей мира. Скорость перемешивания оказывает существенное влияние на скорость растворения. Поэтому в приборе установлен механизм контролирующей скорости вращения корзины. Время, необходимое для

определения растворения зависит от растворимости субстанции, а также от методов анализа, используемых для количественного определения вещества в растворе.

Однако следует отметить, что результаты полученные *in vitro*, не могут полностью заменить исследования проводимые на экспериментальных животных. Только на их основе делается окончательный вывод о биологической доступности препарата *in vivo*. Например, при изучении фенилбутазона в составе десяти различных таблетированных форм — две из них показали низкое растворение *in vitro* и низкую биодоступность *in vivo*. В тоже время одна из форм также имела низкую скорость растворения и, тем не менее, полную (100 %) биодоступность [30]. Несколько иная картина наблюдалась для антидиабетического средства — толазамида. Одна из форм препарата обладала высокими показателями и растворимостью, и биодоступностью. Две другие формы имели низкую скорость растворения, но одна из них имела низкую биодоступность, а другая — высокую. Следовательно, физиологический процесс, отражающий биодоступность препаратов является намного сложнее чем тот, который описывается скоростью растворения вещества (Глава 6).

На растворимость таблеток оказывают значительное влияние как входящие в их состав компоненты, их соотношение между собой, так и технологические параметры процесса таблетирования. Установлено, что растворение в большей степени зависит от подбора вспомогательных веществ, находящихся в составе таблеток, и от давления прессования, чем распадаемость. Подтверждению этого факта могут быть исследования [31] восьми различных форм спирополактона, которые были образованы различными вспомогательными веществами (тальк, желатин, стеарат магния). Отмечены совершенно неоднозначные различия в скоростях растворения, но идентичные показатели в биодоступности этих препаратов. В случае использования сульфата кальция и фосфата кальция в качестве вспомогательных веществ в таблетках их растворимость и биодоступность имеют сходные закономерности.

5.3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

Способность лекарственных форм к соответствующему высвобождению субстанции следует рассматривать как их потенциальное свойство, которое может изменяться в широких пределах и зависит, прежде всего, от состава вспомогательных материалов и технологии изготовления препаратов. Одной из главных причин такого явления — считается процесс взаимодействия между активным и вспомогательными компонентами в составе лекарственной формы.

Анализ литературных данных свидетельствует о незначительных успехах в расшифровке механизмов такого рода взаимодействия. Как правило, рассуждения, касающиеся этого вопроса, ограничиваются заключением о том, что такое взаимодействие имеет место благодаря наличию в молекулах активных групп, их способности к сольватации, к молекулярной ассоциации и зависят от значения величин гидрофильно-липофильного баланса [25]. Поэтому в биофармацевтических исследованиях характеризуются процессы взаимодействия веществ по их фармакокинетическим параметрам. С точки зрения химика их относят к взаимодействиям с образованием комплексов, клатратов, твердых дисперсных систем или адсорбирующих поверхностей.

Между молекулами лекарственного и вспомогательного вещества могут возникать комплексные соединения, характеризующиеся определенной устойчивостью. Тенденция к комплексообразованию зависит от заряда и свойств различных групп молекул, способных образовывать водородные связи (раздел 3.1). В результате взаимодействия образуются соединения различной устойчивости, что оказывает существенное, но различное влияние на физико-химические свойства и терапевтическое действие препарата. Таким способом регулируется и одно из основных свойств лекарственного средства — его растворимость.

Одним из методов совершенствования биофармацевтических свойств лекарств является создание препаратов на основе комплексов включения циклодекстринов. Эти вещества образуют полимергомологический ряд с общей формулой $(C_6H_{12}O_5)_n$. Наибольший интерес представляют три возможных гомолога с $n = 6; 7$ и 8 , так как только они обладают фиксированной конформацией, образующей соответствующий макроцикл. Структурной единицей макроцикла является 2-*D*-глюкоза в пиранозной форме, имеющая конформацию кресла. Глюкопиранозные звенья связаны между собой α -1,4-гликозидной связью. Все первичные гидроксильные группы при C_6 направлены в одну сторону, а все вторичные при C_2 и C_3 в другую. Вторичные гидроксильные группы связаны друг с другом внутримолекулярными водородными связями, и этим объясняется ограниченность вращения глюкопиранозных звеньев и относительная жесткость в растворе молекул циклодекстрина (раздел 3.3).

Все атомы кислорода гликозидных связей направлены внутрь молекулы и образуют на плоскости, перпендикулярной оси симметрии, регулярный многоугольник. Наклонное расположение глюкопиранозных колец позволяет рассматривать молекулу циклодекстрина в виде слегка конического полого цилиндра. При этом шесть-восемь первичных (C_6) гидроксильных групп расположены на более узком (верхнем) торце молекулы, а двенадцать-шестнадцать вторичных (C_2 — C_3) гидроксильных групп размещаются на противоположном более широком (нижнем) торце.

Внутримолекулярная полость циклодекстринов, кроме гликозидных атомов кислорода, содержащих только гидроксильные группы является относительно неполярной по сравнению с водой. Следовательно, циклодекстрины как бы гидрофобны внутри, но гидрофильны снаружи.

В твердом состоянии циклодекстрины — белые кристаллические вещества, содержащие кристаллизационную воду (число ее молекул может меняться). При полном обезвоживании они переходят в аморфную форму. Циклодекстрины могут образовывать нековалентные ассоциаты с гидрофобными органическими

соединениями; при этом они легко кристаллизуются и имеют четко выраженный химический состав.

Интерес к циклодекстринам вызван их уникальной возможностью образовывать комплексы включения типа «гость—хозяин» с веществами различной природы. Эти комплексы, во многих случаях, позволяют изменить физико-химические свойства, а отсюда и фармакологическое действие лекарственных средств.

Соединения включения образуются в результате внедрения одного вещества в полости, находящиеся в кристаллической решетки другого вещества. Включенную молекулу называют гостем, а включающие молекулы — хозяевами. Полости могут иметь туннельные, клеточные и слоистые структуры. Молекулами-хозяевами, кроме циклодекстринов, могут быть цеолиты, графит, мочевины, тиомочевины, холеновые кислоты, целлюлоза и др.

Существуют, по крайней мере, три метода получения комплексов включения, которые детально описаны в обзорной статье [27].

Что касается фармакокинетических профилей лекарств в составе комплексов включения, то значительная часть существующих данных представлена в таблице 5.1.

Из таблицы 5.1 следует, что во всех представленных случаях циклодекстрины значительно увеличивают растворимость гидрофобных веществ, с последующим повышением их биодоступности в кишечнике. Исключение составляют лишь напроксен и толбутамид.

Другой случай образования комплексных соединений — это связывание ионов металлов с анионными или нейтральными лигандами (лекарствами). Основное различие между протолитическим равновесием (раздел 2.1.2) и равновесием с участием ионов металлов определяется тем, что ионы металлов обычно реагируют более, чем с одним участком молекулы лиганда основной природы. В этом случае говорят об образовании хелатного комплекса.

Таблица 5.1

Биофармацевтические свойства комплексов лекарств

Лекарство	Циклодекстрин	Объект исследования	Растворимость	Биодоступность
Спиринолактон	<i>SBE-β-CD</i> , <i>DM-β-CD</i>	крыса	+	+
Оксазепам	<i>β-CD</i>	НО	+	НО
Гризеофульвин	<i>β-CD</i>	крыса, человек	+	+
Цинаризин	<i>SBE-β-CD</i>	собака	+	+
Напроксен	<i>β-CD</i>	человек	+	+
Толбутамид	<i>β-CD</i>	кролик	+	—

Примечания: *β-CD* (β-циклодекстрин);

SBE-β-CD (сульфобутилэфир-β-циклодекстрин);

DM-β-CD (диметил-β-CD);

+ (увеличение показателя);

— (отсутствие);

НО — не определялось

Так, системы ион металла — лиганд могут быть описаны, если предположить ступенчатое образование комплексов MA , MA_2 , ..., MA_n , где M — ион металла, A — лиганд и n — максимальное число лигандов, способных связываться с M . Для последовательного присоединения лигандов к ионам металла можно написать серию констант равновесия K_1 , K_2 , ..., K_n :

$$K_1 = \frac{[MA]}{[M][A]}; \quad K_2 = \frac{[MA_2]}{[MA][A]}; \quad K_n = \frac{[MA_n]}{[MA_{n-1}][A]}.$$

С другой стороны, те же системы могут быть описаны как функции суммарных констант ассоциации β_1 , β_2 , ..., β_n , для которых можно написать $\beta_n = [MA_n]/[M][A]_n$. Эти константы связаны с «постадийными» константами соотношениями $\beta_1 = K_1$, $\beta_2 = K_1K_2$, ..., $\beta_n = K_1K_2$, ..., K_n . Суммарные константы ассоциации могут быть измерены методом кондуктометрии, спектрометрии и при помощи ряда других методов.

Для ионов металлов характерна способность реагировать либо с двумя лигандами (линейное расположение), либо с четырьмя лигандами (расположение лигандов в одной плоскости или углах тетраэдра при центральном размещении иона металла), либо с шестью лигандами (расположение лигандов в углах октаэдра при центральном размещении иона металла). Число комплексующихся лигандов и стереохимия комплекса зависят как от природы иона металла, так и от природы лиганда.

Как правило, константы ассоциации при ступенчатом образовании комплекса имеют тенденцию к уменьшению по мере увеличения числа лигандов. (В качестве примера укажем, что логарифмы констант ассоциации, характеризующих присоединение одной, двух, трех или четырех молекул имидазола к иону Cu^{2+} , равны соответственно 4,36; 3,57; 2,85; 2,06.) Эта тенденция обычно проявляется особенно сильно в тех случаях, когда основная форма лиганда несет суммарный заряд (пример — кислородсодержащий анион), так как присоединение последующих лигандов приводит к возникновению между лигандами постепенно возрастающего электростатического отталкивания.

Исследования, проведенные с такого рода комплексами показали [32] отсутствие желаемого эффекта. Это относится к комплексу тетрациклин-карбонат кальция, для которого не обнаружено улучшения растворимости, а также биодоступности. Аналогичное поведение было описано для лекарственных форм хлорпромазина, образованным субстанцией и полисорбатом 80 с одной стороны и лаурилсульфатом натрия с другой.

На примере хелатных комплексов лекарственных средств показана [33] необходимость осторожного подхода к проблеме увеличения растворения, а отсюда и биодоступности препаратов. Там в Австралии широкое применение нашел препарат для лечения эпилепсии фенитоин, лекарственная форма которого была образована сульфатом кальция. Одним из недостатков такого лекарственного средства, по мнению разработчиков, была его низкая биодоступность. С целью увеличения растворимости препарата, а отсюда и его биодоступности, в 1960 г. в

медицинскую практику была внедрена новая лекарственная форма фенитоина, которая базировалась на новом вспомогательном веществе лактозе. Такая модификация препарата привела к значительному увеличению биодоступности. Однако, вскоре стали поступать многочисленные жалобы на побочные действия лекарства, которые характеризовались как токсические. Следовательно, для препаратов, обладающих узким терапевтическим индексом, необходимо с большой осторожностью варьировать таким показателем как биодоступность.

К еще одному типу взаимодействия лекарственных и вспомогательных веществ относится процесс адсорбции. Явление поглощения одним веществом других веществ называется сорбцией. Сорбция, происходящая только на поверхности тела, называется адсорбцией, в отличие от поглощения в толще поглопителя, называемого абсорбцией. Одной из разновидностей последней является процесс всасывания.

В некоторых случаях отмечено явление адсорбции молекул субстанции на поверхности вспомогательных веществ. Этот процесс способствует увеличению размера образовавшихся частиц, а также их поверхности, что сказывается на их растворимости. В качестве отрицательного примера может быть дикумарол (слабая кислота) адсорбирующаяся на поверхности сахара, талька, гидрата окиси алюминия. Аналогичный эффект проявляет и тальк в составе лекарственной формы хлордиазпоксиды. В тоже время адсорбция дикумарола на поверхности окиси магния приводила к усилению его биодоступности [28]. Аналогичная картина наблюдалась для хлорпромазина, свойства которого улучшались в результате адсорбции на каолине.

Одним из путей повышения терапевтической эффективности препаратов является применение их в лекарственных формах длительного действия. Сюда относятся твердые дисперсные системы, представляющие собой дисперсии одного или нескольких активных ингредиентов в инертном носителе, находящемся в твердом состоянии. Такого рода лекарственные средства могут быть покрыты оболочкой или инкорпорированными. К последним

относятся так называемые матричные таблетки [25]. Матричные системы в составе лекарственных форм образуют непрерывную сетчатую структуру (матрицу), в которой равномерно распределена субстанция. Матрица может медленно растворяться в желудочно-кишечном тракте или выводиться из организма неизменной в виде пористой массы. Матрица является барьером, который ограничивает контакт лекарственного вещества с жидкостями и контролирует высвобождение активного вещества. В зависимости от природы вспомогательных веществ матрицы подразделяются на гидрофильные, гидрофобные и инертные.

Используя технологические приемы приготовления твердых дисперсных систем, были получены соответствующие лекарственные формы разнообразных групп фармакотерапевтических средств: пироксикам, норфлоксацин, нифедипин, оксодинин, ибупрофен, гризеофульвин и др. Во всех перечисленных случаях отмечено [28] увеличение растворимости препаратов по сравнению с аналогичными препаратами, имеющими другую лекарственную форму. Предполагается, что вспомогательное вещество (полиэтиленгликоль) в процессе высвобождения субстанции выполняет роль разрыхлителя и регулятора изменения (понижения) электростатического заряда между частицами лекарства. Последний процесс весьма необходим, так как в твердых дисперсных системах происходит образование кристаллов между лекарственным и вспомогательным веществами.

Следовательно, химическое взаимодействие между лекарственным и вспомогательным веществами, приводящее к образованию комплексов, клатратов или твердых дисперсных систем, способствует распадемости и растворению лекарственной формы, а отсюда улучшению всасываемости и биодоступности. Однако вся перечисленная цепь процессов, обеспечивающих высвобождение субстанции из лекарственной формы, зависит от физиологических факторов организма экспериментальных животных или пациента. К таким факторам относят: pH окружающей среды, связывание с белками, стабильность вещества

в желудочно-кишечном тракте, влияние микрофлоры кишечника и пристеночных ферментов [34].

Несмотря на то, что специальных исследований на эту тему не проводилось, тем не менее на основании косвенных данных можно заключить о важности перечисленных факторов в биофармации. Так, например, указывается на эффективность применения циклодекстрина, в качестве вспомогательного средства, в лекарственной форме хлорпромазина. Этот препарат в кишечнике подвергается метаболической трансформации, катализируемой ферментами микрофлоры. Образующийся при этом продукт реакции имеет низкую степень биодоступности. Благодаря образованию комплекса циклодекстрин-хлорпромазин он становится недоступным для действия микроорганизмов.

Заменяв лактозу на глюконолактон, в составе лекарственной формы аспирина, удалось уменьшить его гидролиз, а отсюда увеличить биодоступность.

Учитывая тот факт, что различные участки желудочно-кишечного тракта имеют разное значение рН среды, подбором специальных вспомогательных средств стало возможным, чтобы процесс всасывания имел место в определенном отрезке, например ранитидин в дистальном участке слепой кишки.

ВСАСЫВАНИЕ

Первым звеном исследовательского блока ADME является процесс всасывания (абсорбция, впитывание, биоусвояемость). Понятие всасывание включает физиологический процесс проникновения различных веществ через слой клеток в лимфу или кровь. Всасывание может происходить с поверхности (кожи, слизистой) или полостей (пищеварительного тракта, плевральной полости, просвета почечного канальца и т. д.).

В процессе всасывания веществ в кровь и лимфу необходимо различать следующие этапы: 1) перенос веществ внутрь клеток — через апикальную плазматическую мембрану; 2) внутриклеточный транспорт с участием поступивших веществ в клеточном метаболизме и их возможной трансформацией; 3) перенос поступивших и преобразованных веществ из клетки в кровь или лимфу, т. е. через базальную и латеральную клеточные мембраны.

В организме млекопитающих всасывание осуществляется во многих органах. Однако наибольший интерес, как в отношении специализации, высокой организации и масштабности всасывания, так и его физиологического значения в поддержании гомеостаза целостного организма, представляет изучение этого феномена в кишечнике. Поэтому в последнем случае под всасыванием понимается совокупность процессов, обеспечивающих переход веществ из полости тонкой кишки в жидкости внутренней среды (кровь и лимфу). Движение веществ из полости тонкой кишки до энтеральной поверхности гликокаликса и далее до внешней поверхности трехслойной мембраны через гликокаликсное пространство определяется в основном градиентом концентраций между энтеральным и базальным отделами гликокаликса и потоком растворителя, направленным в обычных условиях в сторону клетки в результате всасывания

солей и воды. Диффузионное сопротивление гликокаликса для мелких молекул незначительно отличается от диффузионного сопротивления растворителя, поэтому в первом приближении перемещение олиго- и мономеров на этом этапе весьма сходно и может быть описано как процесс пассивной диффузии и как движение растворенных веществ в потоке растворителя.

Приведенные соображения, а также некоторые другие аргументы и математические расчеты заставляют думать, что интенсивность перехода веществ из глубины химуса к поверхности собственно мембраны должна быть примерно одинаковой для мономеров и олигомеров, если только молекулярные объемы последних не настолько велики, что гликокаликс оказывает эффективное сопротивление.

Иначе обстоит дело в отношении обратных мембранно-кавитальных потоков. В случае олигомеров на внешней поверхности клетки (при мембранном гидролизе) или во внутриклеточной жидкости (при внутриклеточном пищеварении) происходит образование мономеров и создается их максимальная локальная концентрация. Низкая концентрация продуктов полного гидролиза в полости создает благоприятные условия для обратного перехода веществ в полость тонкой кишки в направлении концентрационного градиента. Приведенный пример [35, 36] характеризует процесс всасывания питательных веществ, сопряженный с ферментативной трансформацией олигомеров, который реализуется на поверхности апикальной плазматической мембраны энтероцитов, состоящей из мельчайших микроворсинок (длина 1 мк, ширина 0,1 мк). Последние данные, о чем будет сказано ниже, свидетельствуют о том, что трансформационные процессы присутствуют и при всасывании лекарств.

Следовательно, в основе всасывания лежат *транспортные процессы*. Понятие транспорта включает в себя действие по перемещению материи, тепла или еще чего бы то ни было, обусловленное соответствующим градиентом. Обычно передвижение с одного места на другое предполагает наличие транспортного средства, предмета перевозки и направление транспорта.

В повседневной жизни транспорт материалов имеет две стороны: перемещение сырья в место его переработки с целью получения конечных продуктов — с одной стороны, и с другой стороны — транспорт готовых изделий и отходов с места переработки к месту потребления, использования, складирования и хранения. В обоих случаях транспорт имеет четко определенную цель. При осуществлении транспортных процессов для перевозки различных материалов используются более или менее специализированные транспортные средства. Координация движения и оптимальное использование транспортных средств представляют собой трудную организационную проблему, для разрешения которой все большее применение находят компьютерные технологии.

Транспортные явления играют существенную роль во многих физиологических и патологических процессах. Жизненные функции человека, направленные на поддержание гомеостаза, являются, в конечном счете, транспортными функциями. В организме человека транспортные функции максимально комбинируются. Вопрос оптимального, непрерывного обслуживания всех клеток, обладающих множеством индивидуальных особенностей, представляет несомненный интерес и заслуживает внимательного изучения. Тот факт, что бесполезные для одной группы клеток вещества могут служить сырьем, питательным веществом или даже регулятором для другой группы клеток, иллюстрирует комплексный характер вопросов, связанных с биологическим транспортом.

Для обозначения процессов, обеспечивающих транспорт элементов, молекул, веществ и клеток в живом организме, мы считаем полезным термин «*биотранспорт*». Разграничением понятия биотранспорта и систематизацией охватываемых им процессов мы стремимся облегчить изучение биологических процессов, нормальных и патологических, связанных с транспортом в живом организме, внося свой вклад в их уяснение.

В 1961 г. Бенхольд и Отт [37] провели разделение *макротранспорта* — транспортных процессов, происходящих от одного

органа или ткани к другому органу или ткани — и *микротранспорта*, являющегося обменом веществ, происходящим через клеточную мембрану или внутри клеток. Часть макротранспорта — например, перенос химуса, воздуха, мочевины, желчи и др. — имеет место под воздействием непосредственно мышечных элементов, без участия транспортной среды.

Специализированной транспортной системой организма является сердечно-сосудистый аппарат. Были получены данные, свидетельствующие о том, что плазма крови, лимфа и интерстициальная жидкость, помимо функции сольвента, обладают еще значительными особенностями в отношении транспортных процессов. Они содержат определенные вещества и клетки, служащие для процесса переноса, тем самым плазма, лимфа и интерстициальная жидкость представляют транспортную среду организма. Переносчики транспортной среды играют существенную роль в регуляции транскапиллярных обменов переносимых веществ. Макротранспорт с участием транспортной среды состоит из переноса с кровью и интерстициального переноса.

В связи с новыми, современными воззрениями на проблему биотранспорта в классификацию Бенхольда и Отта необходимо ввести понятия *трансцеллюлярного* и *парацеллюлярного* переноса веществ. Транспорт веществ через клеточную мембрану составляет основу трансцеллюлярного переноса [38], а между близлежащими клетками — парацеллюлярный [39]. И, наконец, — участвующие в биотранспорте механизмы могут иметь активный либо пассивный характер. В организме человека все формы биотранспорта взаимно обусловлены и проведенная схематизация помогает лишь разграничению, систематизации и подходу к явлениям.

6.1. МЕМБРАННЫЕ СТРУКТУРЫ КЛЕТКИ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ КИНЕТИКУ ТРАНСЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ТРАНСПОРТА

Если бы клетка состояла только из оболочки и гомогенного внутреннего содержимого (воды), то попав в такую среду лекарственное средство растворилось бы равномерно по всему объему. Такой процесс носит название диффузии. Тем не менее этого не происходит так как клетка имеет строгую компартментализацию за счет разветвленной системы биологических мембран [8, 14, 23, 40].

Мембранные структуры клетки представлены поверхностной мембраной (клеточная или плазматическая) и внутриклеточными:

Поверхностные мембраны	Цитоплазматические мембраны	
Внутриклеточные мембраны	Мембраны, образующие сферические структуры	Лизосомальные Митохондриальные Пероксисомальные
	Мембраны, образующие разветвленную сеть	Гладкий эндоплазматический ретикулум Шероховатый эндоплазматический ретикулум
Мембраны внешней поверхности клетки	Опорные структуры	Клеточная стенка Клеточная оболочка
	Межклеточные структуры	Базальная мембрана
Комплексы клеток	Клеточный пласт Эпителий	

Биологические мембраны представляют собой трехслойный «сэндвич» (белок—липид—белок). Липидный слой в центре, в котором гидрофобные концы молекул направлены друг к другу, а гидрофильные — к белковым слоям, лежащим по обе стороны от липидного слоя (рис. 6.1).

Если ограничиться рассмотрением цитоплазматических мембран и мембран субклеточных органелл, то их основными компонентами являются белки и полярные липиды. Биомембраны обладают сложной гетерогенной структурной организацией, которая обусловлена, во-первых, разнообразием компонентов и, во-вторых, образованием комплексов между ними. Существование белок-липидных комплексов в мембране возможно благодаря гидрофобным взаимодействиям и электростатическим силам, возникающим между полярными группами белков и липидов.

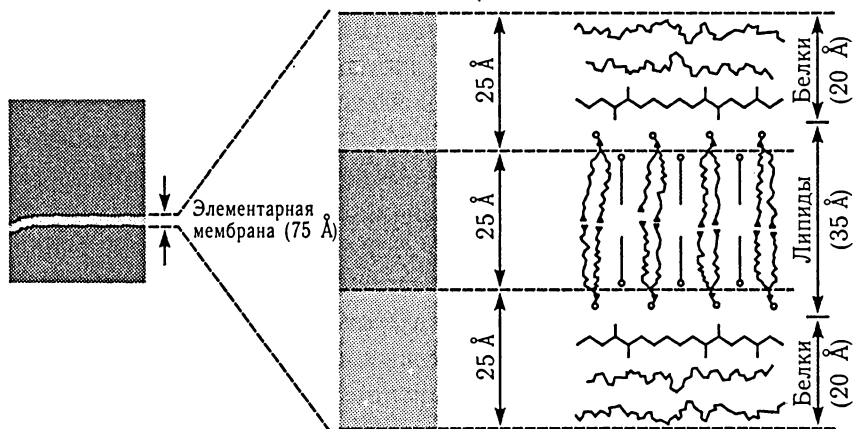


Рис. 6.1. Схема строения элементарной мембраны. Слева — электронная микрофотография мембраны. Светлые кружки — основные группы фосфолипидов (холин, этаноламин); темные кружки — фосфатные группы фосфолипидов; треугольники — концевые участки цепей жирных кислот в молекулах фосфолипидов; светлые кружки с вертикальными линиями — холестерин (по Даусону, Даниелли и Робертсону)

Липиды биомембран представлены в основном глицерофосфолипидами, сфингофосфолипидами и сфинголипидами. Одним из важных компонентов мембран являются стероиды.

Биомембраны существенно отличаются от искусственных мембран из целлофана или других высокомолекулярных веществ. Толщина различных биомембран колеблется в узких пределах (около 8,0—10,0 нм), что определяется бислойной организацией фосфолипидов в биомембране. В бислое гидрофильные части молекул полярных липидов, обращены непосредственно в водную фазу, а гидрофобные (остатки жирных кислот) — образуют ряды параллельных друг другу углеводородных цепей, удерживаемых гидрофобными взаимодействиями.

С учетом размеров полярных групп фосфолипидов и наличия в биомембранах белков и гликопротеидов средняя толщина мембран составляет 7,5 нм.

Мембранные белки в большинстве случаев обладают относительно гидрофобными свойствами. Поэтому они располагаются либо на поверхности мембраны, либо погружаются в толщу гидрофобного слоя. Возможен и такой вариант, когда белок как бы прошивает мембрану насквозь, так что часть молекулы белка находится в мембране, а часть — в водной фазе. Одной из особенностей мембранных белков, взаимодействующих с гидрофобными областями липидов, является повышенное содержание гидрофобных остатков аминокислот (аланин, метионин, пролин, ароматические аминокислоты) по сравнению с гидрофильными.

Белки мембран, функция которых заключается в трансмембранном переносе молекул или ионов, разделены на две группы: переносчики и каналоформеры. И те и другие создают проницаемость мембран путем перемещения вещества с одной поверхности мембран на другую, но переносчики при этом передвигаются в мембране вместе с переносимым веществом. В противоположность им каналоформеры представляют собой молекулярную структуру, формирующую канал проницаемости для строго определенного вещества.

В мембранах существует также большое количество белков осуществляющих функции рецепции и передачи информации.

Таким образом, структура биомембран представляет собой мозаику из липидов и белков, причем часть поверхности мембраны свободна от белков: например, в эритроцитах белки занимают на поверхности 35 %, а в мембранах микросом — 23 %. Исходя из этих данных, была сформулирована жидкомозаичная модель биологической мембраны. Согласно этой модели фосфолипидный бислой, в котором углеводородные цепи молекул фосфолипидов находятся в жидком состоянии, а сами фосфолипиды образуют фазу L_α (ламеллярная). В этот бислой, имеющий вязкость масла, погружены или встроены молекулы белков, способные передвигаться по мембране.

В противоположность прежним моделям, рассматривающим мембраны как системы, состоящие из жестко фиксированных элементов, эта модель представляет мембрану как «море» жидких липидов, в котором плавают «айсберги» белков.

Клетка сохраняет стабильность своей химической структуры и функций в самых различных, постоянно меняющихся условиях. Одним из главных механизмов, посредством которых она обеспечивает это постоянство, является регуляция перемещения (транспорта) веществ внутрь и наружу. Даже внутри клетки различные вещества распределены неравномерно, так что и здесь транспорт веществ строго регулируется. Основную роль в такой регуляции выполняют биомембраны, которые выполняют две различные функции: 1) замедляют диффузию некоторых веществ (почти не влияя на перемещение других) и 2) осуществляют активный перенос веществ против градиента концентрации внутрь клетки (накопление) или наружу (экскреция) за счет соответствующих источников энергии. Такие процессы характерны для эндогенных веществ, которые могут быть включены в естественные метаболические процессы. Однако благодаря сходству по своей химической структуре чужеродных веществ (синтетических лекарств) с эндогенными, первые также проникают через биомембраны. Но в любом случае они подлежат удалению.

При всем разнообразии строения и физико-химических свойств лекарственных веществ существует в основном два пути их проникновения в клетку: 1) через субмикроскопические заполненные водой поры, пронизывающие цитоплазму и соединяющие ее с внешней средой; 2) за счет растворения в липидах, входящих в состав мембран.

Первый из указанных выше способов проникновения свойствен молекулам водорастворимых веществ, а также ионам. Второй способ свойствен водонерастворимым органическим соединениям.

6.2. СТРУКТУРА МЕЖКЛЕТОЧНОГО КОНТАКТА, ОПРЕДЕЛЯЮЩЕГО ПАРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫЙ ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ

Взаимодействие между клетками в ткани и соединение различных тканей в организме обеспечивается немембранными структурами, которые называются *базальными пластинками*. Эти структуры представляют собой как бы основу, которая скрепляет клетки и удерживает их вместе. Несмотря на некоторое функциональное сходство с мембранами, базальные пластинки все-таки нельзя причислить к мембранам хотя бы потому, что они не содержат липидов и не являются непроницаемым барьером для веществ и ионов. Базальные пластинки состоят из полисахаридов, соединенных с белками. Благодаря своим свойствам: вязкости; способности образовывать гели и вызывать адгезию клеток — базальные пластинки не только связывают клетки друг с другом, но и способны поддерживать форму органа в целом.

Базальные пластинки имеют отчетливо выраженное ламеллярное волокнистое строение, напоминающее структуру мембран почечных канальцев, которые осуществляют фильтрацию. По химическому составу базальные мембраны близки к коллагену.

В их состав входят гликопротеины, содержащие дисахаридные цепи в спиральной части волокон и полисахаридные цепи в неспиральных участках. В отличие от коллагена базальные мембраны включают большое количество спиральных участков, S—S-связей и полисахаридных цепей.

Благодаря наличию специфических мест узнавания или изменению форм мембран в некоторых участках взаимодействия клеток внешняя поверхность цитоплазматических мембран многоклеточных организмов играет важную роль в создании *межклеточных контактов*. Этот термин рекомендуется [41] употреблять в тех случаях, когда имеются промежутки между клеточными поверхностями, заполненные внеклеточным материалом. С целью уточнения механизмов взаимодействия близлежащих клеток используются также термины «межмембранное пространство», «парацеллюлярное пространство», «контактные комплексы».

Межклеточный контакт следует рассматривать как сложно организованную систему, состоящую из ряда специализированных элементов. Эти элементы четко идентифицируются с помощью электронной микроскопии, однако их номенклатура до настоящего времени достаточно не разработана. В различных тканях контакты, в зависимости от функционального назначения, могут включать и себя те или иные элементы. В настоящем разделе рассмотрены преимущественно межклеточные контакты эпителиоцитов, так как в состав этих контактов входят все известные типы специализированных элементов. К специализированным элементам межклеточных контактов относят: простое соединение, соединение типа «замка», плотное соединение, область слипания, щелевидное соединение, септированное соединение и лестничное соединение. В формировании этих элементов принимают участие все три компонента клеточной поверхности: надмембранный компонент, или гликокаликс, плазматическая мембрана и подмембранный компонент.

На рис. 6.2. показаны возможные места контактов между клетками эпителия тонкого кишечника. С помощью электронной микроскопии были обнаружены три типа контактных

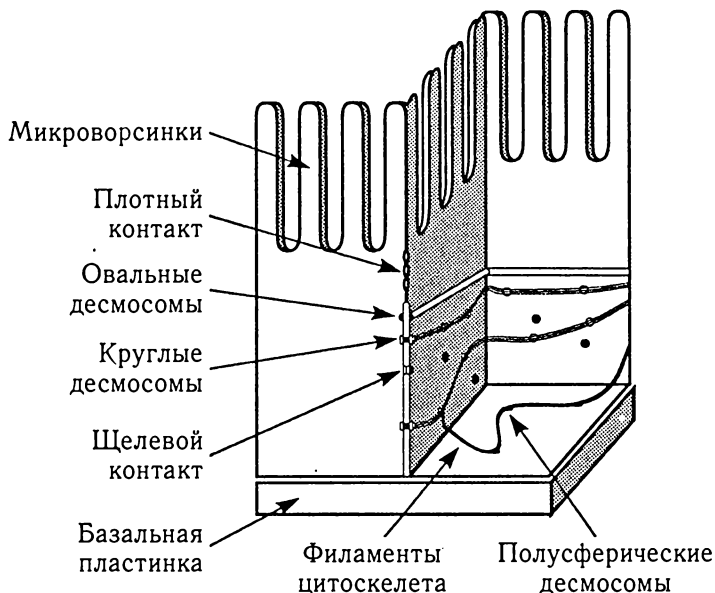


Рис. 6.2. Схематическое изображение эпителия тонкого кишечника

структур: *плотный контакт*, *щелевой контакт* и взаимодействие с помощью *десмосом*.

В зоне плотного контакта (tight junction) две плазматические мембраны полностью смыкаются, при этом цитоплазматические пространства двух контактирующих клеток остаются отделенными друг от друга (рис. 6.3).

В таких контактах наружные участки мембран местами сливаются в общий слой толщиной 2—3 нм. Слияние наружных слоев мембран происходит не по всей площади плотного соединения, а представляет собой серии точечных слияний мембран. Эти точечные слияния, пересекаясь образуют сеть, располагающуюся между апикальными краями контактирующих клеток.

На протяжении более чем ста лет термин «плотное соединение» использовался в качестве описательной системы для пространства контактирующих между собой двух клеток. Благодаря последним сорока годам исследований в данной области,

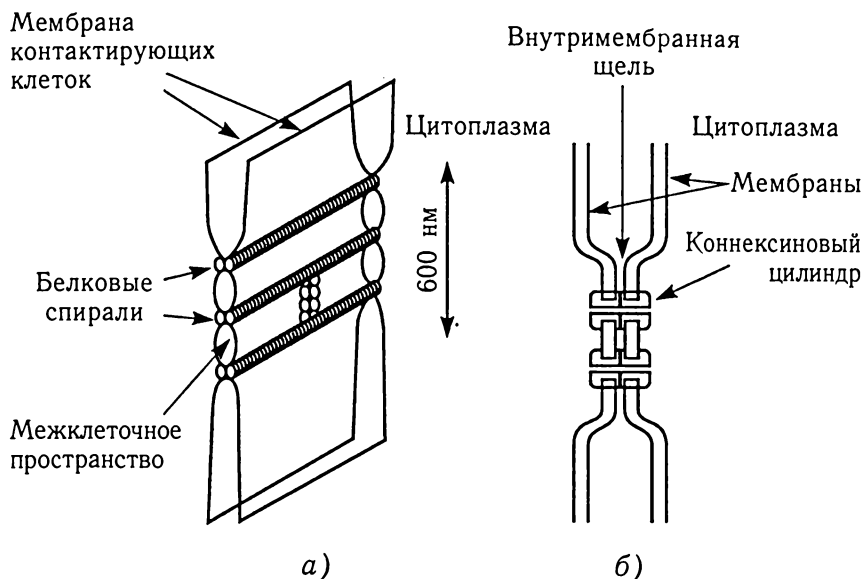


Рис. 6.3. Схематическое изображение плотного контакта (а) и щелевого контакта (б)

наши воззрения на природу плотного контакта, как своего рода цементирующей массы, значительно изменились. Несмотря на то, что наши знания о строении и функции этого образования еще далеки от идеальных, тем не менее уже сейчас достаточно данных, свидетельствующих о том, что это сложно организованная динамическая мультибелковая структура, избирательно проницаемая для определенных гидрофильных соединений (ионы, нутриенты, лекарства).

Морфологические особенности и регуляторные свойства плотного контакта, а также тот факт, что он является проницаемым для гидрофильных соединений незначительной молекулярной массы свидетельствуют об ограниченности просвета между двумя клетками. Существуют, по крайней мере, две гипотезы, объясняющие это явление. Первая, касается диаметра пор между контактирующими клетками. Так у энтероцитов человека они составляют 0,3—0,6 нм [43]. Благодаря различному

размеру межклеточных пор, наблюдаемых вдоль кишечного тракта одного вида экспериментальных животных, а также их диаметра, обусловленного видом животного, скорости парацеллюлярного переноса лекарств могут значительно колебаться. Так, например, антагонист β -адренорецепторов атенолол ($\log D_{7,4} = -1,9$; молекулярная масса — 226) проявляет довольно высокую степень абсорбции в кишечнике собак (90 %) и только половину в организме крыс и человека [44].

Другой представитель этой группы — ксимотерол ($\log D_{7,4} = -10$; молекулярная масса — 339) имеет более низкие показатели (у собак 36 %, у крыс и человека соответственно 19 и 9 %).

Увеличение молекулярной массы, за счет присоединения соответствующих заместителей, в полиэтиленгликоле, кардинально меняло степень их парацеллюлярного транспорта. Варьирование молекулярной массой производных полиэтиленгликоля (281—591) уменьшало степень абсорбции веществ в кишечнике крыс от 79 до 2 %. Для организма собак, при использовании производных полиэтиленгликоля с молекулярными массами 600—900 этот показатель изменялся в интервале 100—13 %. Предполагается [45], что процессы, происходящие в организме крыс, в большей степени, напоминают аналогичные явления, наблюдаемые в организме человека.

Вторая гипотеза предполагает наличие между контактирующими клетками молекулярной структуры, управляющей проницаемостью щели (канала). В возбудимых мембранах при понижении покоя ниже определенной пороговой величины открываются каналы, по которым ион натрия поступает внутрь клетки. Предполагают, что в состоянии покоя в нервном волокне натриевые каналы закрыты воротами, которые открываются при деполяризации мембраны.

Иногда термин «ворота» применяют не только к каналу, но и к отдельному белку-каналоформеру. Например, на внутренней мембране митохондрий локализована H^+ —АТФаза, формирующая канал проницаемости для ионов водорода,

по которому они проникают с внутренней поверхности мембраны на наружную.

Наличие гипотетических ворот у контактирующих клеток должно быть отмечено присутствием в области плотного соединения специфических белков. В настоящее время установлено в этой области клеток существование целой группы трансмембранных и цитозольных белков, взаимодействующих не только между собой, но и со структурами цитоскелета.

Первым белком, который был изолирован из плотного контакта, а затем изучен является *окклюдин*. Его название, в переводе с английского (*occludin*), указывает на его запирающую (закрывающую) функцию.

Впервые окклюдин был обнаружен в гепатоцитах цыплят [46], а позже в различных клетках многих видов экспериментальных животных [47, 18]. Он относится к мембранным белкам и состоит из четырех доменов. Окклюдин выполняет двойную роль: 1) интеграция всех компонентов плотного контакта; 2) барьерная функция. При этом особое значение в перечисленных процессах имеют *N*-концевой участок молекулы окклюдина и его домены, расположенные на поверхности внешней мембраны клеток. Что касается *C*-концевого участка окклюдина, то ему отводится регуляторная роль, обусловленная его возможностью взаимодействовать с другими белками плотного контакта, которые в свою очередь связаны со структурами цитоскелета.

Таким образом, взаимодействие плотного соединения с цитоскелетом и способность окклюдина к фосфорилированию дают возможность выполнять этим белком регуляторные функции.

Недавно в плотном контакте обнаружено новое семейство специфических белков-окклюдинов. Эта группа белков подобна окклюдину и содержит четыре предполагаемых домена. К настоящему времени количество изученных *клаудинов* насчитывает 15 разновидностей [49]. Экспрессия клаудинов 1 и 2 в фибробластах, у которых в норме отсутствуют эти белки, показала, что они, наряду с окклюдинами, играют значительную роль в процессах парacellularного транспорта (рис. 6.4).

молекулы ZO-1 взаимодействует с C-концевой частью окклюдина, а вторая половина — с F-актином цитоскелета. Аналогично ведет себя и молекула ZO-2: половина ее N-концевой части взаимодействует с окклюдином, однако вторая — с N-концевым участком ZO-1. И, наконец, ZO-3 взаимодействует с окклюдином и ZO-1. Следовательно, во взаимодействии TJAPs возможны только два комплекса (ZO-1-ZO-2 и ZO-1-ZO-3). Тройственный комплекс в этой системе возникать не может, так как не возникает взаимодействие ZO-2-ZO-3.

Взаимосвязь отдельных компонентов (белков) в составе плотного контакта соседних клеток представлена на рисунке 6.4 [48].

Если плотный контакт действительно может избирательно пропускать необходимые молекулы, то этот процесс должен определенным образом регулироваться. Как и во всех иных биологических процессах это могут быть физиологическая, клеточная или молекулярная регуляции. Основным показателем этого явления считается напряженность (диффузионное сопротивление) плотного соединения, изменение силы которой влечет за собой регулирование скорости парацеллюлярного транспорта веществ.

На примере некоторых питательных веществ предполагается [51], что их парацеллюлярный перенос является альтернативным, а скорее всего дополнительным процессом в общей цепи пищеварения. Так после употребления пищи, содержащей значительные количества глюкозы и аминокислот, напряженность плотного контакта уменьшается, что приводит к повышению процента всасываемости этих нутриентов парацеллюлярным путем. Более того активация натрий-зависимой системы активного транспорта глюкозы (Глут 1) в значительной степени увеличивает парацеллюлярные процессы.

Не являясь исключением гормоны и нейротрансмиттеры (вазопрессин, ангиотензин II, эпинефрин), увеличивающие парацеллюлярную биодоступность ряда веществ. Аналогичные свойства отмечены и для цитокинов [48].

Определены некоторые клеточные и молекулярные механизмы регуляции действия белковых структур плотного контакта. Значительную активность по отношению к плотному соединению проявляют вторичные мессенджеры и протеинкиназы, определяя функциональное состояние его барьерной активности. Конечным этапом молекулярной регуляции является фосфорилирование белков плотного контакта и его сокращение или расслабление в системе актин-миозин микрофиламентов. Наиболее чувствительным звеном в общем процессе регулирования функции плотного контакта является фосфорилирование окклюдина. Очевидно с этим процессом связано становление и развитие структурных и барьерных функций плотного контакта.

Найдены и исследованы ингибиторы парацеллюлярного транспорта веществ. Они включают: хелатные комплексы иона кальция (Ca^{2+}), желчные кислоты, анионные суфрактанты, жирные кислоты (средней длины), эфиры жирных кислот, фосфорные эфиры.

В опытах на изолированных из аденокарциномы человека монослойных клеток Сасо-2 было показано, что ингибиторы активности плотного соединения действуют в различных концентрациях (от $0,2 \mu\text{M}$ карнитинпальмитила до $20 \mu\text{M}$ желчных кислот). Механизмы действия этих веществ все еще остаются не выясненными. Существуют различные предположения, которые касаются определенной группы ингибиторов. Все они суммированы в обзорной статье [48] и их механизм действия разбит на несколько биохимических направлений: 1) активация фосфолипазы С; 2) влияние на каскад тирозинкиназа-фосфатаза (ингибирование тирозинкиназы неселективными ингибиторами фосфатазы); 3) увеличение концентрации АТФ.

В связи с обсуждаемой проблемой данной главы, пожалуй, наиболее сложным является вопрос взаимодействия молекул клеточной адгезии и плотного контакта. Межклеточная адгезия определяется в своей основе мембранными белками, принадлежащими к классу кадгеринов (*E*, *P* и *N*). Все они являются кальций-зависимыми трансмембранными гликопротеинами.

В их молекулярной структуре обнаружен внеклеточный домен, непосредственно участвующий в межклеточном связывании. Однако он не стимулирует формирование полноценного межклеточного соединения, поскольку для этого необходима и цитоплазматическая часть кадгерина, связывающаяся с внутриклеточными белками из группы *катенинов* [52].

В эпителиальных клетках были идентифицированы три катенина (α , β и γ). Межклеточные каналы полностью открыты при внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ниже 10^{-7} моль/л и полностью закрыты при концентрации ионов $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л. В случае повреждения или гибели клетки, с биологической точки зрения, она должна быстро отсоединиться от соседней. При этом происходит значительное повышение внутриклеточной концентрации ионизированного кальция. Он может поступать в клетку через поврежденную мембрану, а также накапливаться вследствие невозможности поврежденной клетки откачивать Ca^{2+} из цитозоля [52]. В свою очередь, хелатирование внеклеточного Ca^{2+} может привести к усилению активности внутриклеточных протеинкиназ с последующим ускорением дезинтегративных процессов межклеточных соединений. И, наоборот, уменьшение, с одной стороны, парацеллюлярной проницаемости и дезинтеграции межклеточных контактов, с другой, осуществляется низкими концентрациями внеклеточных ионов кальция, ингибирующих активность протеинкиназ, в частности тирозинкиназы.

Любой биологический процесс имеет относительную норму и отклонение (патологию). Не является исключением и барьерная функция плотного контакта. Предполагается, что некоторые воспалительные процессы кишечника обусловлены чрезвычайно высокой степенью парацеллюлярной проницаемости этой ткани. Низкая проницаемость легочной эпителиальной ткани приводит к некоторым аллергическим реакциям [53].

В отдельных местах между клетками могут встречаться обширные межклеточные зоны со щелью между соседними

клетками шириной 10—20 нм (рис. 6.3). В этой области к мембране со стороны цитоплазмы прилегают микрофиламенты диаметром 6,0 нм [39, 41, 42].

В условиях щелевого контакта (gap junction), ионы кальция могут играть важную роль в процессах связывания. Высокие концентрации ионов кальция приводят к «закрыванию» щелей.

Структура щелевых контактов детально изучена с помощью электронной микроскопии. Оказалось, что эта область устлана глобулярными белковыми субъединицами, которые расположены таким образом, что образуют правильные полигональные структуры решетчатого типа с периодом 10 нм. Они образуют своего рода канал с внешним диаметром 8 и внутренним — 2 нм. Глобулярные белки в области щелевых контактов получили название *коннексонов*. Каждый коннексон состоит из шести субъединиц — *коннексинов*. Они принадлежат к надсемейству белков, обеспечивающих клеточную адгезию. В результате соединения двух коннексонов образуется канал, связывающий близлежащие клетки. Такие соединения у различных видов животных могут иметь различные свойства. В настоящее время установлены гены, кодирующие структуру коннексинов.

Щелевой контакт, включающий соответствующий канал диаметром 1,5 нм пропускает вещества, имеющие небольшую молекулярную массу (неорганические ионы, сахара, аминокислоты, нуклеотиды, витамины). Они практически непроницаемы для белков, нуклеиновых кислот и полисахаридов. Для АТФ и циклической АМФ отмечена возможность транспорта посредством щелевого контакта [42].

На наружной поверхности цитоплазматической мембраны находятся *десмосомы* — круглые, овальные и полусферические структуры, размер которых постоянен у разных клеток и равен в диаметре 0,2 нм (рис. 6.1, 6.5). Наряду с этим существуют клетки, лишенные десмосом. От десмосом вглубь цитоплазмы, каждой из контактирующих клеток на расстояние до 4 нм тянутся фибриллы.

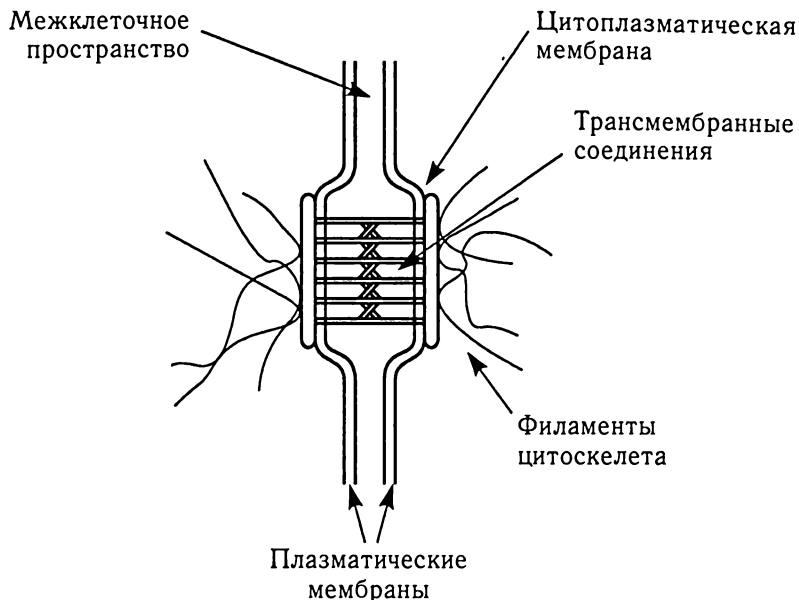


Рис. 6.5. Схематическое изображение десмосомы

Одна и та же клетка может взаимодействовать с соседними клетками, и с помощью плотных контактов, и десмосомами, и через щелевые контакты.

Как следует из рис. 6.2 в той области клеточной поверхности, где осуществляется межклеточное взаимодействие, расположено бесчисленное число *миковорсинок*. Увеличение с их помощью клеточной поверхности ускоряет обмен веществ и их транспорт. В клетке все системы находятся в тесной взаимосвязи.

В том случае, когда клетка одновременно контактирует с несколькими, целесообразно выделить область, ее контакта с одной соседней клеткой, так называемую «контактную площадку». Под контактной площадкой следует понимать совокупность специализированных элементов и их комплексов, участвующих в контакте одной клетки с соседней. Совокупность всех контактных площадок, принадлежащих одной клетке, образует ее *контактную поверхность*.

Таким образом, можно выделить несколько структурных уровней организации межклеточного контакта: специализированные элементы (соединения), комплексы элементов, контактные площадки и контактную поверхность.

Определяя функции межклеточных контактов представляется вполне оправданным назвать как основную — *системообразующую и барьерную*. Можно выделить два вида системообразующей функции — связывание элементов системы между собой и отграничение данной системы. Системообразующая функция межклеточных контактов выражается, во-первых, в осуществлении связей между клетками (механической, ионной, макромолекулярной и, возможно, других) и, во-вторых, в установлении и поддержании барьеров с избирательной проницаемостью в организме.

Барьерная функция межклеточных контактов обеспечивает разграничение внутренней среды организма и внешней среды, а также различных полостей тела, в том числе и изоляцию межклеточной области. Эта функция в наиболее выраженной степени свойственна межклеточным контактам эпителиальных тканей. Барьерная функция, во-первых, проявляется в предотвращении проникновения тех или иных веществ или частиц через клеточный пласт; во-вторых, может выражаться в обеспечении избирательного перехода молекул через межклеточный контакт. По-видимому, межклеточные контакты представляют собой одну из основных структур, входящих в состав гистогематических барьеров.

6.3. МЕХАНИЗМЫ БИОТРАНСПОРТА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Одна из важнейших функций биомембран заключается в отделении клетки от внешней среды и сохранении автономности внутреннего устройства клетки. Благодаря наличию

мембраны внутри клетки и в ее органеллах постоянно поддерживаются высокие концентрации необходимых веществ и ограничивается поступление чужеродных веществ, не участвующих в процессах жизнедеятельности. Компартиментализация внутреннего содержимого клетки, т. е. пространственное разделение мембранами внутриклеточных систем, позволяет независимо осуществлять различные, иногда противоположно направленные процессы, а также их тонкую регуляцию. Таким образом, мембраны и мембранные контакты одновременно выполняют две прямо противоположные функции: барьерную, благодаря которой клетка защищена от поступления чужеродных веществ, и транспортную, обеспечивающую поступление в клетку необходимых для ее жизнедеятельности веществ и ионов.

Процессы движения растворенных веществ через мембраны могут быть опосредованными или неопосредованными. Неопосредованный транспорт растворенного вещества представляет собой чисто физическую диффузию вещества вдоль его концентрационного градиента. Диффундирующая молекула во время прохождения через мембрану не модифицируется химически и не соединяется с другими видами молекул. Для опосредованных, или облегченных, транспортных процессов характерны кинетика насыщения (т. е. транспортная система может насыщаться транспортируемым растворенным веществом) и специфичность к транспортируемому веществу.

Возможность опосредованного транспорта обуславливается белками, способными обратимо связывать специфические субстраты. Эти транспортирующие молекулы белка имеют различные названия: транспортные системы, переносчики, носители или транслоказы.

Следовательно, если рассматривать процессы всасывания лекарств в эпителии кишечника, то они могут быть представлены (рис. 6.6) как простая диффузия (трансцеллюлярный и парацеллюлярный пути транспорта) и перемещение веществ с помощью транспортных систем. Последний путь осуществляется только с помощью трансцеллюлярного транспорта.

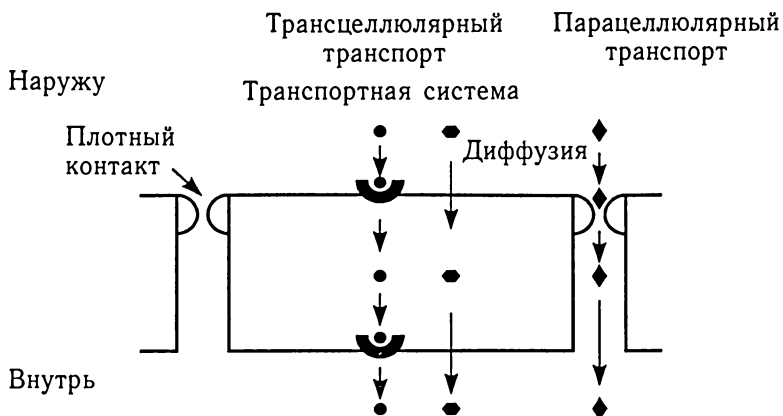


Рис. 6.6. Схематическое изображение транспорта веществ в эпителиальных клетках кишечника

Опосредуемый транспорт включает два механизма переноса веществ: 1) облегченный; 2) активный.

Изменение свободной энергии переноса веществ определяет тип транспорта. Если транспортируются незаряженное соединение из одного отсека в соседний, то свободная энергия его перемещения может быть выражена следующим уравнением:

$$\Delta G = RT \ln \frac{C_2}{C_1} = 2,303RT \ln \frac{C_2}{C_1},$$

где G — изменение свободной энергии; R — газовая постоянная; T — абсолютная температура; C_1 и C_2 — концентрации веществ в соответствующих отсеках.

Если вещество ионизировано (анионы или катионы), то для них в случае транспорта изменения свободной энергии имеет следующее выражение:

$$\Delta G = RT \ln \frac{C_2}{C_1} + ZF\Delta\phi,$$

где Z — заряд иона; F — число Фарадея; $\Delta\phi$ — трансмембранная разность потенциалов.

Активный транспорт представляет собой процесс с положительной ΔG , для протекания которого требуется энергия, например, в виде АТФ. Пассивный транспорт — это когда перемещаемый материал движется внутрь по концентрационному градиенту, т. е. ΔG отрицательна.

Существует еще один тип транспорта веществ в клетке, однако к лекарственным веществам он имеет косвенное отношение. Это так называемый *цитоз*, т. е. механизм переноса веществ через мембрану, который сопровождается весьма существенными (но обратимыми) изменениями архитектоники мембран. При эндоцитозе поступление веществ в клетку осуществляется путем образования локальных впячиваний плазматической мембраны, которые затем могут отшнуровываться от мембраны и двигаться внутрь клетки с содержащимся внутри транспортируемым веществом.

Во всех перечисленных случаях осуществляется перенос веществ как внутрь клетки, так и наружу. В последнем случае он называется соответственно эндоцитозом и экзоцитозом. Перенос веществ внутрь за счет диффузии и транспортных систем очень часто называют абсорбцией, а наружу — секрецией.

При эндоцитозе транспортируется не только вещество, но и растворитель вода, которая помимо этого может проникать в клетку за счет пассивного транспорта.

Следовательно, основными процессами передвижения веществ в мембранах клеток является пассивный и активный тип транспорта. Движущей силой для пассивного транспорта нейтральных молекул является градиент концентраций (градиент химического потенциала), а для ионов — градиент электрохимического потенциала.

Активный транспорт веществ также связан с химическим и электрохимическим потенциалом, однако, в отличие от пассивного транспорта, он сопряжен с потреблением энергии.

Химическим потенциалом данного вещества μ_k называется величина, численно равная энергии Гиббса, приходящаяся на один моль этого вещества. Математически химический потенциал

определяется как частная производная от энергии Гиббса G по количеству k -го вещества, при постоянстве температуры T , давления P и количеств всех других веществ $M_i (i \neq k)$:

$$\mu_k = \left(\frac{\partial G}{\partial M_k} \right)_{P, T, M_{i \neq k}}$$

Для разбавленного раствора концентрации вещества C :

$$\mu = \mu_0 + RT \ln C,$$

где μ_0 — стандартный химический потенциал, численно равный химическому потенциалу данного вещества при его концентрации 1 моль/л в растворе.

Электрохимический потенциал — величина, численно равная энергии Гиббса G на один моль данного вещества, помещенного в электрическом поле.

Для разбавленных растворов:

$$\bar{\mu} = \mu_0 + RT \ln C + ZF\phi,$$

где $F = 96\,500$ Кл/моль — число Фарадея, Z — заряд иона электролита (в элементарных единицах заряда), ϕ — потенциал электрического поля, $T[K]$ — температура.

6.3.1. ПАССИВНЫЙ ТРАНСПОРТ

Пассивный транспорт вещества из мест с большими значениями химического (электрохимического) потенциалов к местам с его меньшим значением. Этот процесс идет с уменьшением энергии Гиббса и поэтому может идти самопроизвольно без затраты энергии.

Несмотря на одинаковый принцип, заложенный в понятии пассивного транспорта, все же имеется определенная классификация в его реализации (рис. 6.7).

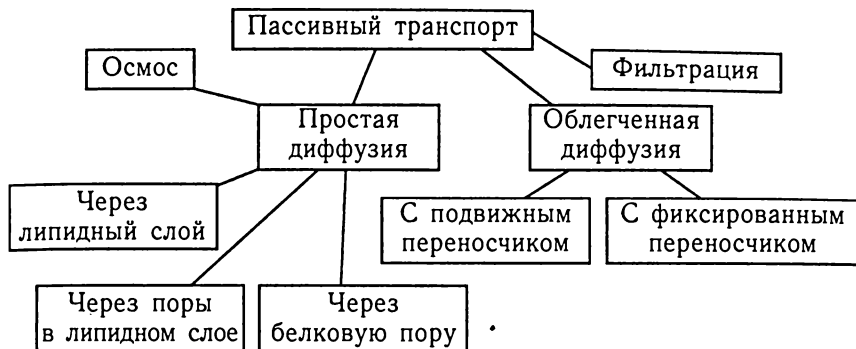


Рис. 6.7. Классификация видов пассивного транспорта

В основе классификации положено понятие диффузии (простая, облегченная).

Вследствие молекулярно-кинетического движения частицы испытывают случайные смещения, при которых они перемещаются, например, вверх и вниз.

Однако если в растворе распределение частиц растворенного вещества неравномерно, например содержание их у дна сосуда больше, чем в верхнем слое жидкости, то число смещений снизу вверх будет больше, чем в обратном направлении, и поэтому частицы будут передвигаться снизу вверх. Такой процесс самопроизвольного выравнивания концентрации частиц по всему объему раствора под влиянием теплового или броуновского движения называется диффузией; он является общим как для растворов низкомолекулярных веществ, так и для коллоидных растворов.

Поскольку равномерное распределение вещества в растворе наиболее вероятно, в термодинамическом отношении процесс диффузии идет с увеличением энтропии и является самопроизвольным. Согласно *закону Фика*, количество вещества dm , продиффундировавшего за время dt через площадь S , пропорционально изменению концентрации на единицу расстояния или градиенту концентрации dc/dx :

$$-dm = DS \left(\frac{dc}{dx} \right) dt.$$

Знак минус перед dm указывает, что процесс идет в направлении уменьшения концентрации. Коэффициент пропорциональности D называется коэффициентом диффузии вещества; он численно равен количеству вещества (в молях), проходящему через единицу площади (1 см^2) за единицу времени (1 сек) при градиенте концентрации, равном единице (т. е. изменению концентрации в 1 моль/см³ на расстоянии в 1 см). Для биомембран этот закон имеет следующее выражение:

$$\frac{\text{Площадь поверхности мембраны} \times \text{Разность концентраций по обе стороны мембраны}}{\text{Толщина мембраны}}.$$

6.3.1.1. ПРОСТАЯ ДИФфуЗИЯ

Основные разновидности простой диффузии через мембрану представлены на рис. 6.8.

Путем пассивного транспорта в живую клетку поступают немногие вещества (вода, кислород, диоксид углерода). В общем случае этот процесс протекает медленно и неспецифично, так как зависит от таких параметров, как заряд и размер молекулы

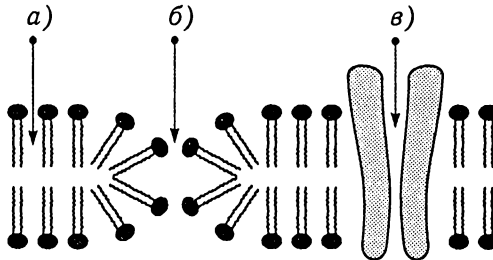


Рис. 6.8. Основные разновидности простой диффузии через мембрану: через липидный бислой (а), через пору в липидном бислое (б), через белковую пору (в)

вещества, его коэффициент распределения. Поэтому пассивный транспорт трудно контролировать клеточной мембраной. Например, в случае искусственных мембран проницаемость для стереоизомеров аминокислот и сахаров одинакова, в то время как биомембраны обладают высокой стереоспецифичностью: через них проникают только *D*-изомеры сахаров и *L*-аминокислоты. Одна из особенностей проницаемости биомембран заключается в избирательности, в высокой селективности по отношению к переносимым через мембрану веществам, т. е. в значительном различии проницаемостей для разных молекул и ионов.

При изучении процессов проницаемости различных клеток по отношению ко многим веществам было отмечено, что скорость транспорта зависит от липофильности этих соединений. Однако правило относительной липофильности не приложимо к таким малым молекулам как вода, метанол, формальдегид и др. Они проникают в клетку гораздо быстрее, чем можно было бы объяснить, исходя из липофильности. Цитофизиологами был сделан вывод о том, что липидная мембрана пронизана мелкими порами, заполненными водой и обеспечивающими быстрое проникновение малых полярных молекул, т. е. биомембраны рассматриваются как сито.

Следует отметить, что количество пор в мембране клетки незначительно. Так диаметр пор в мембране эритроцита составляет 0,7—0,9 нм, а занимают они только 0,06 % всей поверхности клетки. Этот факт еще раз показывает как сильно клетка изолирована от окружающей среды [8].

Что касается ионов, то они обладают наименьшей проникающей способностью. В тоже время мембраны клетки обычно отличают анионы от катионов; как правило они более проницаемы для последних. Разницу в скоростях пассивной диффузии между анионами и катионами можно объяснить предположив, что поры несут электрический заряд. Если, например, заряд поры отрицателен, то это будет уменьшать ее эффективный диаметр для анионов и в тоже время никак не будет влиять на диффузию катионов.

Изучение процессов пассивной диффузии свидетельствует о том, что клеточная мембрана может служить для неполярных молекул растворителем, а для полярных — молекулярным ситом.

Наличие белковых пор и их участие в трансмембранном переносе веществ не вызывает сомнения. В последнее время аналогичные процессы приписываются и порам липидного бислоя клеток. Остановимся на некоторых положениях таких взглядов, которые с нашей точки зрения могут быть наиболее вероятными.

Бимолекулярный слой фосфолипидов составляет основу любой клеточной мембраны (раздел 6.1). Непрерывность его определяет барьерные и механические свойства клеток. В процессе жизнедеятельности непрерывность бислоя может нарушаться с образованием структурных дефектов типа сквозных гидрофильных пор. Вполне естественно ожидать при этом изменение всех функций клеточной мембраны, включая проницаемость и стабильность.

Липидные поры возникают в результате тепловых флуктуаций липидного бислоя или рождаются при мембранном стрессе, сопровождающем фазовый переход мембранных липидов, при электрическом пробое или осмотическом лизисе. Судьба мембраны в этих случаях будет зависеть вероятностным образом от того, будет ли липидная пора превышать некоторый критический размер или нет. В первом случае мембрана порвется, во втором — ее структура сохранится. Минимальные радиусы липидных пор могут быть сравнимы с размерами избирательных белковых каналов.

С точки зрения проницаемости липидные поры принципиально отличаются от белковых каналов своим происхождением и исключительной динамичностью. В то время как белковые каналы имеют строго определенные размеры, сохраняющиеся в течение всей жизни клетки, размеры липидных пор в процессе затекания варьируют в широких пределах. Однако эта изменчивость имеет предел. Если радиус поры меньше критического, то пора в процессе затекания должна пройти все промежуточные

радиусы и достигнуть минимального размера. Вопрос о возможности полного затекания липидных пор остается открытым. Предполагается, что полному затягиванию поры препятствуют мощные силы гидратации, проявляющиеся при сближении стенок гидрофильных пор.

Липидные поры в отличие от белковых ионных каналов не обладают выраженной избирательностью, что коррелирует с их сравнительно большими исходными размерами. Ясно, однако, что в процессе затекания липидные поры могут достигать сколько угодно малых размеров, в том числе сравнимых с размерами белковых ионных каналов, что может приводить к перераспределению ионных токов в мембране, например, при возбуждении. Известно далее, что после выключения стрессового воздействия бислойная липидная мембрана может вернуться в состояние с низкой проводимостью, что подразумевает достижение порами размера, недостаточного для прохождения гидратированных ионов. Таких образом, гидрофильные липидные поры универсальны в том отношении, что могут быть использованы клеткой для транспорта высокомолекулярных веществ, ионов и молекул воды.

На рис. 6.7 в качестве отдельного примера простой диффузии представлены процессы *осмоса*. Под ним понимают преимущественное движение воды через полупроницаемые мембраны (непроницаемые для растворенного вещества и проницаемые для воды) из мест с меньшей концентрацией растворенного вещества в места с большей концентрацией. Осмос — по сути дела, простая диффузия воды из мест с ее большей концентрацией в места с меньшей концентрацией. Явление осмоса обуславливает гемолиз эритроцитов в гипотонических растворах.

Фильтрацией называется движение раствора через фильтры в мембране под действием градиента давления. Это явление играет важную роль в процессах переноса воды через стенки кровеносных сосудов.

6.3.1.2. ОБЛЕГЧЕННАЯ ДИФFUЗИЯ

Перенос веществ и ионов через мембрану за счет диффузии происходит в направлении снижения электрохимического потенциала. Он может быть ускорен, если будет осуществляться с помощью переносчика. Возможны различные механизмы такого переноса. Это транспорт с помощью переносчиков за счет диффузии переносчика вместе с веществом в мембране (так называемые подвижные переносчики); перенос вещества через поры (каналы). Отсюда облегченный транспорт получил второе название — облегченная диффузия, при которой скорость транспорта возрастает линейно с увеличением концентрации переносимого вещества A . В случае облегченной диффузии в области больших концентраций вещества (A) наблюдается насыщение: скорость транспорта достигает максимального значения V_{\max} (рис. 6.9 при условии, что неспецифическая проницаемость равна нулю).

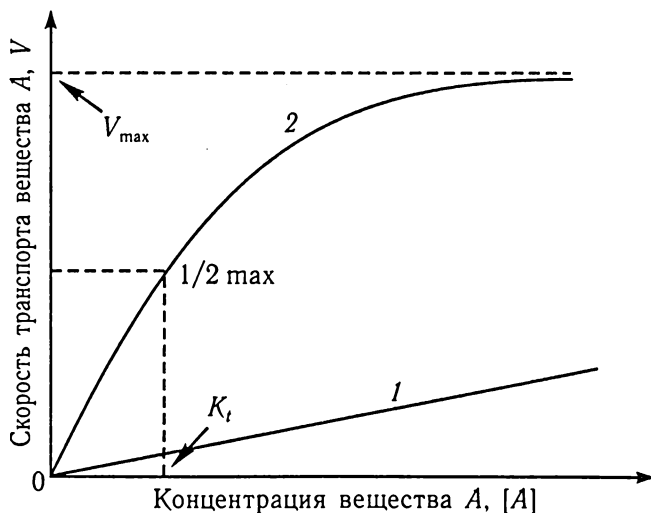


Рис. 6.9. Зависимость начальной скорости транспорта вещества A от его концентрации при простой (1) и облегченной (2) диффузии

Это выполняется и в случае, когда начальная скорость равна нулю при нулевой концентрации вещества на внутренней стороне мембраны и в том случае, когда внутренняя концентрация вещества A_i не равна нулю, но много меньше внешней концентрации A_0 .

На рис. 6.10 показан механизм облегченной диффузии с участием переносчика [40]. Проникающее вещество A , образует на внешней стороне мембраны в водной фазе комплекс вещество-переносчик (CA). Постулировано, что только CA может свободно проникать через мембрану. На внутренней стороне мембраны со стороны водной фазы происходит распад комплекса и освобождение A . В начальный момент концентрация CA равна нулю. Уравнение, описывающее перенос A в комплексе с переносчиком, практически полностью совпадает с уравнением для ферментативной реакции образования фермент—субстратного комплекса (раздел 4.2; уравнение 4.10). Однако переносчики отличаются от фермента тем, что могут транспортировать A как в прямом, так и в обратном направлении, в то время как

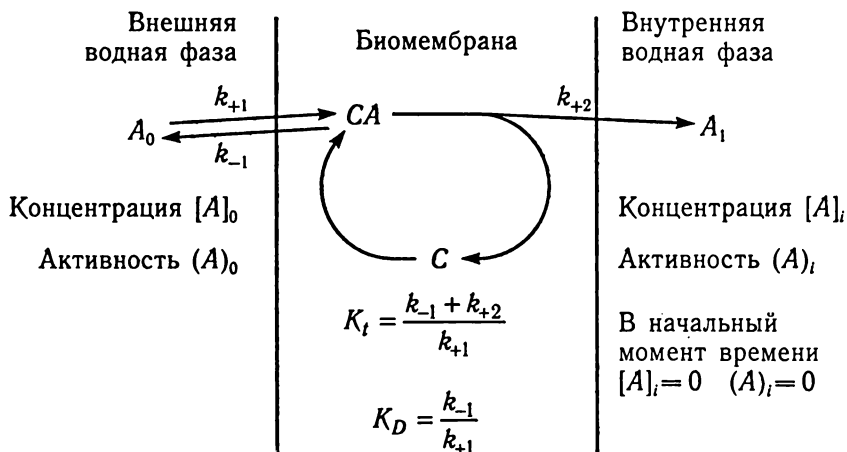


Рис. 6.10. Облегченная диффузия при участии переносчика: K_i — константа Михаэлиса для процесса переноса вещества A K_D — константа диссоциации комплекса CA k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} — константы скорости транспорта вещества A в направлении, указанном на рисунке

ферментативная реакция превращения субстрата в продукт протекает в одном направлении.

В случае если скорости образования и распада вещества с переносчиком превышают скорость диффузии, перенос молекул может быть описан уравнением Михаэлиса-Ментен (4.19, заменив при этом S на A , E на C). Это уравнение может быть использовано для определения «кинетических параметров» процесса диффузии, т. е. величина V_{\max} (максимальная скорость) и K_m (константа Михаэлиса).

При транспорте с помощью переносчиков близких по структуре веществ может наблюдаться взаимное конкурентное ингибирование, аналогичное процессу, который происходит в ферментативных реакциях. Этот факт подтверждает существование в молекуле переносчика специфических участков связывающих A .

Благодаря облегченной диффузии витамин B_{12} всасывается из кишечника и, возможно, катехоламин проникает в нервные клетки [46].

Следовательно, облегченный транспорт относится к процессам, в которых вещество движется через мембрану только по определенным путям, посредством способных к насыщению механизмов, не требующих непрямого снабжения энергией. При облегченной диффузии структурные состояния транспортного белка не отличаются существенно по энергии, и переход из состояния с более низкой энергией в состояние с более высокой энергией может быть осуществлен за счет энергии, освобождающейся при связывании самого лиганда.

6.3.2. АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ

Активным транспортом называют процессы, в которых молекула должна двигаться через мембрану независимо от направления ее концентрационного градиента. Чаще всего это происходит

из области с более низкой концентрацией в область с более высокой и сопровождается увеличением свободной энергии, которое составляет $5,71 \lg C_2/C_1$ кДж·моль⁻¹. Как указывалось ранее это процесс переноса веществ из мест с меньшим значением электрохимического потенциала в места с его большим значением.

Так как активный транспорт в мембране сопровождается ростом энергии Гиббса, он не может идти самопроизвольно, т. е. для такого процесса необходимо сопряжение с какой-нибудь самопроизвольно протекающей реакцией. В целом, это может осуществляться двумя путями: 1) в сопряжении с процессом гидролиза АТФ, т. е. за счет затраты энергии, запасенной в макроэргических связях; 2) опосредованный мембранным потенциалом и/или градиентом концентрации ионов при наличии в мембране специфических переносчиков.

В первом случае транспорт осуществляется с помощью электрогенных ионных насосов, работающих за счет свободной энергии гидролиза АТФ. Их относят к специальным систем интегральных белков и называют *транспортными АТФазами*. В настоящее время известны три типа электрогенных ионных насосов, осуществляющих перенос ионов через мембрану: $K^+ - Na^+ -$ АТФазы, за счет энергии, освобождающейся при гидролизе каждой молекулы АТФ, в клетку переносится два иона калия и выкачиваются три иона натрия; в $Ca^{2+} -$ АТФазе за счет энергии гидролиза АТФ переносится два иона кальция; в $H^+ -$ помпе — два протона.

Во втором случае транспорт веществ является вторичным, для которого глубоко исследованы три схемы.

Однонаправленный перенос иона в комплексе со специфическим переносчиком получил название *унипорта*. При этом через мембрану переносится заряд либо комплексом если молекула переносчика электронейтральна, либо пустым переносчиком, если транспорт обеспечивается заряженным переносчиком. Результатом переноса будет накопление ионов за счет снижения мембранного потенциала. Такой эффект наблюдается

при накоплении ионов калия в присутствии валиномицина в энергизированных митохондриях.

Встречный перенос ионов с участием односторонней молекулы — переносчика получил название *антипорта*. Предполагается при этом, что молекула переносчика образует прочный комплекс с каждым из переносимых ионов. Перенос осуществляется в два этапа: сначала один ион пересекает мембрану слева направо, затем второй ион — в обратном направлении. Мембранный потенциал при этом не меняется. По-видимому, движущей силой в этом процессе является разность концентраций одного из переносимых ионов. Если исходно разность концентрации второго иона отсутствовала, то результатом переноса станет накопление второго иона за счет уменьшения разности концентраций первого. Классическим примером антипорта служит перенос через клеточную мембрану ионов калия и водорода с участием антибиотика нигирицина. Необходимо отметить, что большинство белков-переносчиков функционируют по типу антипорта, т. е. движение вещества через мембрану становится возможным только в обмен на какое-либо довольно специфическое вещество, имеющее тот же заряд, но двигающееся в обратном направлении. Таким образом, выход какого-либо основного компонента клетки по концентрационному градиенту, может управлять движением идущего навстречу вещества против его градиента и совершать «работу» до тех пор, пока обе движущие силы не уравновесятся.

Совместный односторонний перенос веществ с участием двухстороннего переносчика называется *симпортом*. Предполагается, что в мембране могут находиться две электронейтральные частицы: переносчик в комплексе с катионом и анионом и пустой переносчик. Поскольку мембранный потенциал в такой системе переноса не изменяется, то причиной транспорта может быть разность концентраций одного из ионов. Считается, что по схеме симпорта следует, что этот процесс должен сопровождаться значительным смещением осмотического равновесия, поскольку в одном цикле переносятся через мембрану две частицы в одном направлении.

Благодаря наличию достаточно хорошо разработанных теорий, механизмов переноса ионов и эндогенных органических веществ в клетке стало возможным интерпретировать данные, полученные в экспериментах с лекарствами (раздел 6.3.3).

По аналогии с рис. 6.10 активный транспорт можно представить таким образом, как показано на рис. 6.11.

В этом случае переносчик C образует на внешней стороне мембраны с лекарством (A) комплекс CA . Он проникает в мембрану, отщепляя A с ее другой стороны. В случае активного транспорта концентрация A на внутренней стороне мембраны может быть на много больше концентрации на наружной. В отличие от пассивного транспорта (рис. 6.10) комплекс CA используя энергию АТФ, превращается в комплекс $C'A$, который легко отщепляет A (рис. 6.11). Учитывая необходимость энергетических затрат для осуществления транспорта CA на противоположную сторону мембраны, можно считать, что K_i (константа расщепления) на внутренней стороне больше K_0 . Это так называемое ассиметричное расщепление комплекса лекарство-переносчик.

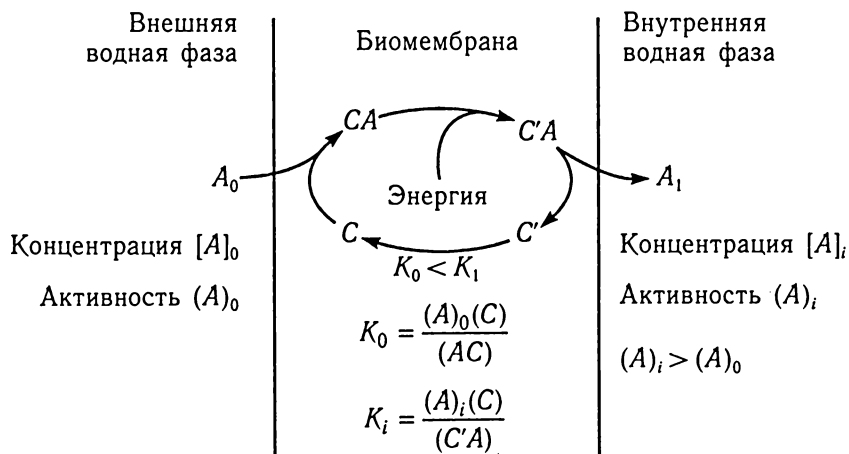


Рис. 6.11. Активный транспорт вещества A_0 и диссоциации его комплекса с переносчиком C в виде $C'A$ у внутренней поверхности мембраны

В живых организмах активные транспортные механизмы широко распространены и их можно рассматривать как одну из фундаментальных функций клетки. Например, в клетках имеется высокая концентрация калия и низкая концентрация натрия в отличие от внеклеточного пространства, где эти ионы находятся в обратном соотношении. Мембраны свободно проницаемы для обоих ионов и ассиметрическое распределение поддерживается путем постоянного «накачивания» натрия из клетки наружу и калия внутрь. Секретция HCl в желудке является настоящим активным транспортом H^+ и Cl^- . Йод концентрируется в щитовидной железе по аналогичному механизму. Сахара переносятся против более высокой концентрации в кишках и проксимальных почечных канальцах. Аналогично ведут себя аминокислоты в кишках, почках, мышцах и мозге. Секретция органических кислот (*пара*-аминобензойной, гиппуровой) почечными канальцами является активным транспортным процессом [54].

Механизм активного транспорта высокоспецифичен, так как он был создан природой для удовлетворения биологической потребности организма в необходимых питательных веществах или выведения из него продуктов их метаболизма. Что касается лекарственных средств, подвергающихся активному транспорту, то они в этом случае должны быть близки по химическому строению к естественным веществам организма. Путем активного транспорта в кишечнике всасывается аналог пиридина фторафур и железо. С помощью того же механизма леводофа проникает через гематоэнцефалический барьер. В почечных канальцах секретируются лекарства, относящиеся к органическим кислотам и основаниям.

Подводя итог рассмотрению механизмов трансмембранного транспорта веществ необходимо еще раз подчеркнуть, что в процессе жизнедеятельности границы клетки пересекают разнообразные вещества, потоки которых эффективно регулируются. С этой задачей справляется клеточная мембрана с встроенными в нее транспортными системами, включающими ионные

насосы, систему молекул-переносчиков и высокоселективные ионные каналы.

Такое обилие систем переноса на первый взгляд кажется излишним, ведь работа только ионных насосов позволяет обеспечить характерные особенности биологического транспорта: высокую избирательность, перенос веществ против сил диффузии и электрического поля. Парадокс заключается, однако, в том, что количество потоков, подлежащих регулированию, бесконечно велико, в то время как насосов всего три. В этом случае особое значение приобретают механизмы ионного сопряжения, получившие название вторичного активного транспорта, в которых важную роль играют диффузные процессы. Таким образом, сочетание активного транспорта веществ с явлениями диффузионного переноса в клеточной мембране — та основа, которая обеспечивает жизнедеятельность клетки.

6.3.3. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ТРАНСПОРТНЫХ БЕЛКОВ

Транспортные системы трансцеллюлярного переноса веществ включают специфические переносчики белковой природы. Анализ карт электронной плотности таких белков показал, что они состоят из нескольких глобулярных участков, которые слабо связаны между собой. Такие участки получили название доменов, которые скручиваются и раскручиваются независимо друг от друга. Следовательно, домен рассматривается как относительно автономная структурно-функциональная единица (Глава 3).

Изучение рекомбинантных ДНК позволило сделать вывод о том, что гены эукариотов дискретны и состоят из экзонов, кодирующих отдельные участки аминокислотных последовательностей и интронов (некодирующих участки). Оказалось, что границы доменов в полипептидной цепи белка точно соответствуют границам экзонов структурных генов. Следовательно, экзоны это геномные эквиваленты белковых доменов.

Благодаря наличию доменов белки-переносчики способны узнавать определенные лиганды и транспортировать их через мембраны.

Белки, осуществляющие транспорт веществ и ионов не модифицируют их структуру. Обычно их подразделяют на две группы: переносчики и каналоформеры.

Заполненные водой гидрофильные каналы, или поры, этих белков имеют строго определенную форму, соответствующую тому или иному иону или молекуле. Иногда канал проходит не внутри одной белковой молекулы, а между несколькими соседними молекулами. Диффузия по каналам идет в обоих направлениях (облегченная диффузия). Транспортные белки, по которым проходят ионы, называются ионными каналами. Обычно ионные каналы снабжены «воротами», т. е. могут открываться и закрываться. Ионные каналы, способные открываться и закрываться, играют важную роль при проведении нервных импульсов.

У белков-каналов форма фиксирована. У белков-переносчиков форма, наоборот, претерпевает быстрые изменения, до 100 циклов в секунду. Они существуют в двух состояниях, и механизм их действия напоминает игру в «пинг-понг». Связывающие участки белка-переносчика в одном состоянии («пинг») обращены наружу, а в другом («понг») внутрь клетки. Чем выше концентрация растворенных молекул или ионов, тем больше шансов на то, что они окажутся связанными. Если концентрация растворенного вещества снаружи выше, чем в клетке, как в примере с глюкозой, то реальный поток этого вещества будет направлен внутрь, и оно будет поступать в клетку. Именно так глюкоза проникает в эритроциты. Перемещение такого рода имеет все характерные признаки диффузии, хотя оно и облегчается участием белка.

Активный транспорт (однаправленный) осуществляется при помощи белков-переносчиков, локализующихся в плазматической мембране. Этим белкам, в отличие от белков-каналов и белков-переносчиков, определяющих облегченную диффузию веществ, для изменения их конформации требуется энергия. Поставляет эту энергию АТФ, образующийся в процессе дыхания.

Такие белки получили название насосов (раздел 6.3.2). Они локализованы в мембране таким образом, что пронизывают всю ее толщу. Если это натрий-калиевый насос, то с внутренней стороны мембраны к нему поступает натрий и АТФ, а с наружной — калий. Перенос веществ через мембрану совершается в результате конформационных изменений, которые претерпевает этот белок.

Активный транспорт осуществляется всеми клетками, но в некоторых случаях он играет особо важную роль. Именно так обстоит дело в клетках эпителия, выстилающего кишечник (раздел 6.4.1) и почечные каналцы (раздел 9.1.1), поскольку функции этих клеток связаны с секрецией и всасыванием.

Согласно теоретическим соображениям, для транспортного процесса необходимо, чтобы транспортирующие белки находились в мембране в форме агрегатов из близких по размеру двух или более полипептидных цепей (доменов).

Предполагается, что вдоль центральной оси этого агрегата проходит наполненный водой канал. Если этот агрегат представляет собой димер из двух идентичных полипептидных цепей, он должен иметь ось симметрии, параллельную этому каналу, т. е. перпендикулярную плоскости мембраны. Активный центр, специфичный к транспортируемому лиганду, должен располагаться в полипептидной зоне внутри канала. При активном транспорте в одном из двух структурных состояний полипептидного агрегата активный центр обращен к водной фазе на одной стороне мембраны. Конформационное изменение полипептидной цепи, происходящее за счет поставляемой энергии, вероятно, позволяет связанному лиганду повернуться к другой стороне мембраны. Этот механизм находится в соответствии с концепцией фиксированных пор или каналов в плазматической мембране, образованных за счет специфической организации мембранных белков, а также согласуется с данными об асимметрии в расположении мембранных компонентов и о наличии белковых молекул, прошивающих всю толщу мембраны.

Благодаря успехам молекулярной биологии и генетики удалось идентифицировать и установить структуру большого числа белков, транспортирующих различные лекарственные средства. Существует и определенная классификация, построенная на том в каком направлении белки транспортируют вещества (внутри или наружу клетки):

- транспортные системы органических катионов;
- транспортные системы органических анионов;
- нуклеозидпереносящие системы;
- *P*-гликопротеины;
- сывороточный альбумин.

6.3.3.1. ТРАНСПОРТНЫЕ СИСТЕМЫ ОРГАНИЧЕСКИХ КАТИОНОВ (ОСТ)

К семейству ОСТ относится большое число белков, переносящих различные органические катионы [55]. Это могут быть эндогенные биологически активные амины (ацетилхолин, холин, дофамин, эpineфрин, норэpineфрин, гуанидин, N^1 -метилникотинамид, тиамин), лекарства (циметидин, амилорид, морфин, хинин, верапамил, триметоприм, хинидин, тетраэтил-аммоний) и ксенобиотики (паракват). Большая их часть представляет собой первичные, вторичные, третичные или четвертичные амины, которые в условиях физиологических значений pH несут положительный заряд, определяющий соответствующее значение их pK_a .

Наибольшее количество ОСТ обнаружено в печени и почках. Однако, весьма значительное их содержание в эпителии кишечника, синцитиотрофобластах плаценты, нейронах [56].

Различают два класса ОСТ: потенциал-зависимые белки, транспортирующие органические катионы внутрь клетки и H^+ -градиент — зависимые (энергия переноса H^+ через мембрану), обеспечивающие передвижение веществ из клетки. К пер-

вому классу относятся три семейства белков: ОСТ1, ОСТ2, ОСТ3, а ко второму два: ОСТN1, ОСТN2.

Структурная организация всех ОСТ близка и представлена 12-ю трансмембранными доменами с большой экстрацеллюлярной гидрофобной петлей между первым и вторым, а также интрацеллюлярной петлей между шестым и седьмым доменами (рис. 6.12.).

Наружная петля ОСТ содержит гликозилированные, а внутренние — фосфорилированные участки. Методами клонирования была дана характеристика и определены особенности транспорта органических катионов различными семействами ОСТ. Так ОСТ1 и ОСТ2 используют в качестве лигандов различные эндогенные и экзогенные органические катионы, проявляя при этом незначительную специфичность [57]. В отличие от них ОСТ3 проявляет субстратную специфичность и маркерным веществом для этой системы является метил-4-фенилпиридин ($K_m = 91 \mu\text{M}$). По степени связывания лигандов, можно расположить в следующем порядке: амфетамин > деипрамин > метамфетамин > дофамин > серотонин ($IC_{50} = 49\text{—}970 \mu\text{M}$).

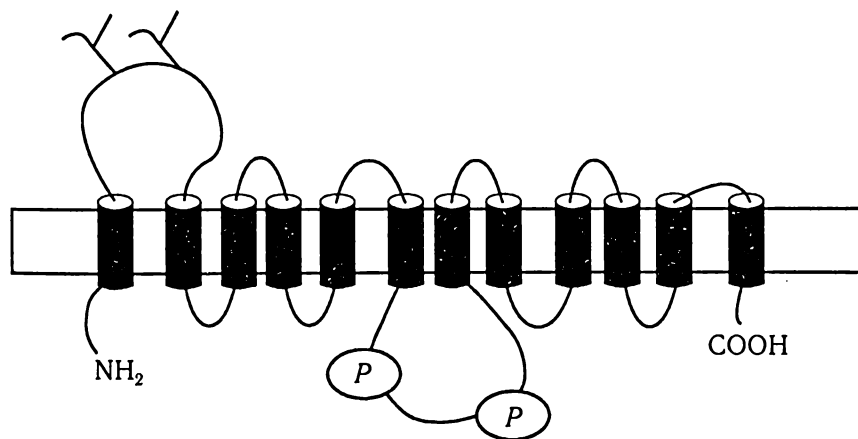


Рис. 6.12. Схематическое изображение ОСТ (P-участки фосфорилирования)

Транспортные системы OСТN1 и OСТN2 в основном локализованы в печени, почках, мышцах, легких, сердце и плаценте. Им также не свойственна субстратная специфичность. Однако отмечено ингибирование бензилпенициллином и салициловой кислотой процессов транспорта цимитидина [58]. Четвертичные амины, в свою очередь, замедляют свое передвижение с помощью OСТN2 в присутствии цитометидина.

6.3.3.2. ТРАНСПОРТНЫЕ СИСТЕМЫ ОРГАНИЧЕСКИХ АНИОНОВ (OAT)

Выделяют [59] две группы переносчиков органических анионов. Первая представлена семейством oatp (organic anion transporter).

В настоящее время идентифицировано девять систем относящихся к oatp: oatp1, oatp2, oatp3, OAT-K1, OAT-K2, OATP, PGT (переносчик простагландина) и печеночно-специфичный переносчик — 1 (LST-1). В печени и почках крыс экспрессируются oatp1, участвующие в транспорте желчных кислот, стероидных гормонов, лейкотриенов; oatp2, переносящие холат, таурохолат, конъюгаты эстрогенов, оуабаин, дигоксин, а также oatp3 (тироксин, трийодтиронин, таурохолат).

Почечные OAT-K1 и OAT-K2 транспортируют метотрексат и фолиевую кислоту, а OAT-K2, кроме того — таурохолат и простагландин E₂. Для OATP печени лигандами являются бромсульфофталеин, холат, таурохолат, гликохолат. Кроме того, эта система способна переносить в эндотелиальных клетках опиодные пептиды [60].

Используя различные приемы молекулярной биологии, было доказано [61], что PGT и LST-1 являются изоформами oatp и, очевидно, играют значительную роль в желчном клиренсе.

Вторая группа анион-переносящих белков представлена четырьмя изоформами (OAT1, OAT2, OAT3 и OAT4). Молекулярная организация OAT аналогична OСТ [59].

В зависимости от источника энергии, необходимой для транспортных процессов, все ОАТ делятся на три группы: 1) Na^+ — зависимые; 2) Na^+ — независимые; 3) использующие энергию АТФ.

Первая и третья группы являются субстрат-специфичными, у второй она отсутствует. Основными лигандами этих систем считаются следующие органические ионы: ОАТ 1 (*l*-аминогиппуровая кислота, дикарбоксилаты, циклические нуклеотиды, простагландин Е, лактамные антибиотики, нестероидные противовоспалительные средства, диуретики); ОАТ2 (*l*-аминогиппуровая кислота, производные салициловой и ацетилсалициловой кислот, простагландин Е, дикарбоксилаты); ОАТ3 (циметидин, сульфатэстрон); ОАТ4 (сульфатэстрон).

6.3.3.3. НУКЛЕОЗИД-ПЕРЕНОСЯЩАЯ СИСТЕМА (NT)

Настоящая система принимает участие в транспорте широкого круга лекарственных средств — производных нуклеозидов.

Нуклеозидам свойственны как трансцеллюлярные, так и парацеллюлярные механизмы транспорта. Однако определенной группе нуклеозидов соответствует отдельная NT [62].

В настоящее время известно восемь изоформ NT. Классификация этих белков построена на их функциональных и фармакологических свойствах, включая и транспортные механизмы [55]. Названия отдельных изоформ содержат определенные термины: равновесность (*e* — equilibrative), концентрационность (*c* — concentrative), степень связывания (чувствительность) к нитробензилмеркаптопуририбоза (*s* — sensitive, *i* — intensitive) и избирательный порядок проникновения через барьеры. Исходя из вышеизложенного, все изоформы NT записываются следующим образом: *es*/ENT1, *ei*/ENT2, *cit*/N2, *cit*/N4, *cgs*/N5, *cgs*/N6.

Следовательно, к настоящему времени обнаружены только две NT (*es* и *ei*), относящиеся к равновесным. Обе они осуществляют транспорт лекарственных средств производных пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов. Причем, перемещение веществ в этом случае имеет место как внутрь, так и наружу клеток. Отличительной чертой *es* и *ei* является их чувствительность к нитробензилмеркаптопуринрибозе. Процесс переноса лигандов обоими белками ингибируется низкими концентрациями (0,1—100 нМ) дипиридамола и дилазепы. Локализованы *es* и *ei* во многих органах и тканях экспериментальных животных и человека.

В отличие от предыдущих изоформ NT концентрационно-зависимые (остальные шесть) имеют определенную тканевую локализацию. Они в значительных количествах обнаружены в клетках тонкого кишечника, в спленоцитах, макрофагах, микроглии. Все они, за исключением *cs*/N5 и *csg*/N6 не чувствительны к нитробензилмеркаптопуринрибозе и дипиридамолу [63].

Проникновение нуклеозидов в клетку посредством этой группы NT предусматривает вторичный активный транспорт (раздел 6.3.2). В качестве примера можно привести транспорт Na^+ через базальную мембрану клеток эпителия тонкого кишечника, благодаря чему создается градиент концентрации Na^+ между цитоплазмой и просветом кишки. За счет градиента концентраций Na^+ и осуществляется транспорт нуклеозидов NT. Основные субстраты данной группы NT — следующие нуклеозиды: *cif*/N1 (пурины, гуанозин и формацин В); *cit*/N2 (пиримидины, тимидин — тест субстрат); *cit*/N4 (аденозин, гуанозин); *cib*/N3 (пурины, пиримидины); *cs*/N5 (аденозин, формицин В); *csg*/N6 (гуанозин) [64].

Молекулярная организация обеих групп NT различна (рис. 6.13).

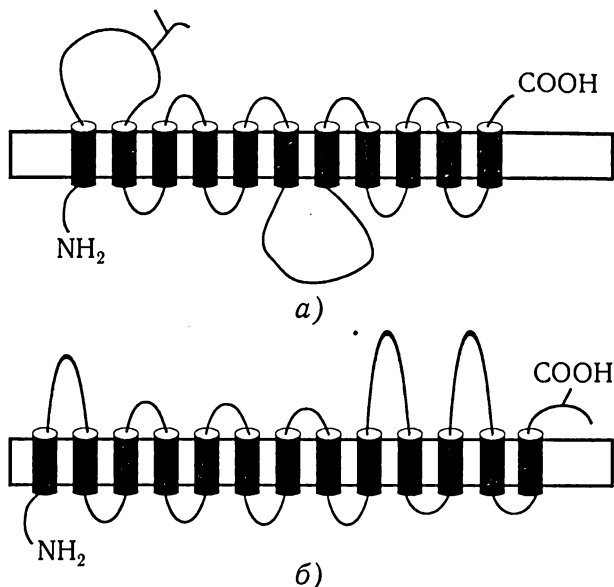


Рис. 6.13. Схематическое изображение строения NT: а) — *es* и *ei*; б) — N1—N6

6.3.3.4. СИСТЕМЫ, ВЫВОДЯЩИЕ ИЗ КЛЕТОК ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ВЕЩЕСТВА

В противоположность ОСТ, ОАТ и NT, участвующих, как правило, в переносе веществ в обоих направлениях, существуют белок-переносящие системы только выводящие, «выкачивающие» соединения из клеток. Сюда относят *P*-гликопротеины (*P-gp*) и семейство белков, обеспечивающих не чувствительность организма к действию лекарств.

Название «*P*-гликопротеины» было получено в связи с регуляторной функцией этих белков клеточной проницаемости (*P-permeability*).

Подобно транспортной АТФазе *P-gp* принадлежат к наиболее распространенному суперсемейству АВС — транспортеров

(ATP — binding cassette proteins). Молекулярная масса *P-gp* составляет 170 кД.

Точный механизм действия *P-gp* не выяснен, но имеется ряд гипотез о его функционировании. Возможно, цитоплазматическая часть транспортера при взаимодействии с лигандом претерпевает конформационное изменение, способствующие «челночному» передвижению вещества [55].

Согласно другому предположению, *P-gp* модифицирует структуру мембраны, что приводит к выходу липофильного соединения из внутреннего слоя в наружный с последующим выведением в просвет сосуда. Такая модель разработана для *mdr2*, действующего как флипаза для фосфотидилхолина [62].

Наконец *P-gp* может действовать подобно протонному насосу, повышая внутриклеточный pH и, таким образом, уменьшая пассивное поступление веществ внутрь клетки. Активация белков этой группы определяет развитие толерантности к действию нейротропных и других классов лекарственных веществ, проникающих в мозг, а также мультирезистентности опухолевых клеток. В последнем случае выделены и идентифицированы, в качестве подсемейства, MDR переносчики (multidrug resistance). Интенсивная экспрессия генов MDR в раковых клетках обуславливает удаление цитостатических соединений, используемых при химиотерапии рака, и делает раковую опухоль резистентной к этим препаратам [66].

В настоящее время установлено, что *P-gp* являются продуктами генов MDR, которые представлены в организме человека двумя разновидностями: MDR1 и MDR2. Оба они клонированы и секвестированы. Для экспериментальных животных используются другие термины: MDR1 (мыши и крысы имеют по две изоформы — *mdr1a* и *mdr1b*; хомяки — *P-gp1* *P-gp2*; MDR2 (мыши и крысы — *mdr2*, хомяки — *P-gp3*).

Структура *P-gp* представлена (рис. 6.14), чередующимся тандемом, соединенным между собой линкерным участком. Каждый домен содержит по шесть трансмембранных сегмента. Домены между собой связаны еще одним гидрофильным,

интрацитоплазматическим доменом, содержащим участок, связывающий АТФ (ABD).

Каждый домен имеет также три предполагаемых гликозилированных участка, начинающихся с петли у первого. Однако в процессах связывания лекарств они не принимают участия, так как эта функция принадлежит доменам ABD [67].

Субстратами *P-gp* являются вещества различного химического строения: антрациклины (доксорубин, даунорубин, титоксатрон), алкалоиды (винкристин, винбластин), токсины (этопозид, тенипозид), иммунодепрессанты (циклоспорин А), сердечные гликозиды (дигоксин), антибиотики (индинавир, ритонавир), блокаторы кальциевых каналов (верапамил), антагонисты кальмодулина (трифлюоперазин) и др. Большинство из перечисленных веществ могут быть не только субстратами, но и ингибиторами в реакциях взаимодействия с лекарством — *P-gp*, которое осуществляется более чем в одном месте связывания.

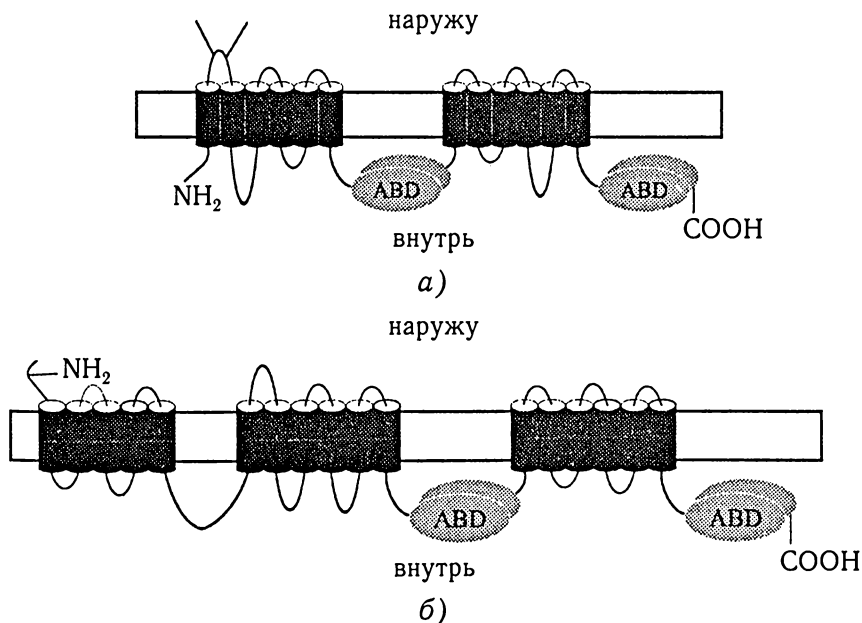


Рис. 6.14. Схематическое изображение *P-gp* (а) и *MRP* (б)

Вторая группа ABC белков, участвующих в клеточном транспорте лекарств и относящихся также к MDR — семейство гликопротеидов MRP (multidrug resistance protein). Сегодня известно семь изоформ (MRP1, MRP2, MRP3, MRP4, MRP5, MRP6 и MRP7), состоящих из 1325—1545 аминокислот. Все они представлены двумя трансмембранными доменами, каждый из которых состоит из шести сегментов. Кроме того MRP-1, -2, -3 и -6 в NH₂-терминальном участке содержат дополнительный (третий) домен (рис. 6.14). Однако он не является необходимым для транспорта лекарств. В тоже время, линкер, связывающий оба тандема с третьим доменом является основополагающим в этом процессе [68].

Наиболее характерным распространенным представителем этой группы является MRP1. Его молекулярная масса составляет 190 кД, а наличие гликозилированных и фосфорилированных участков делает его близким к *P-gp*, а отсюда и субстрат-специфичным. В целом, оба белка являются гомологичными и отличаются друг от друга 15 % аминокислотной последовательностью. Для MRP1 выяснена удивительная транспортная роль, так как он выводит из клетки различные конъюгаты лекарственных средств (глутатионовые, глюкуроновые, сульфатные). Они образуются в различных органах и тканях в результате второй фазы метаболизма лекарств (Глава 8). Этот процесс имеет определенное отношение также и к элиминации (Глава 9) и кишечной абсорбции лекарств (раздел 6.4.1.). Кроме того, MRP1 играет значительную роль в регуляции внутриклеточного редокс-потенциала, транспорта ионов и элиминации токсичных эндо- и экзоксенобиотиков, включая и тяжелые металлы (соли мышьяка).

Что касается MRP2 (сМОАТ) то его транспортные функции обуславливают желчную секрецию различных глутатионовых и глюкуроновых конъюгатов. Мутации гена MRP2 приводят к развитию гипербилирубинемии. Напротив, MRP3 (МОАТ-D), который локализуется в базолатеральных мембранах гепатоцитов, участвует в процессах захвата желчных кислот из кишечника [55].

Физиологическая роль остальных MRP не установлена. Однако для MRP4 (MOATB) и MRP5 (MOAT-C) показана возможность транспортировать ряд производных нуклеотидов и нуклеозидов.

В целом, предполагается наличие двух механизмов транспорта лигандов с помощью MRP. По первому, анионы органических веществ непосредственно перемещаются через мембрану. Согласно второму механизму, катионы и нейтральные органические соединения могут перемещаться только в присутствии восстановленной формы глутатиона, который не является субстратом для этой группы транспортных белков. Точных данных, характеризующих механизм описанного котранспорта не существует. По-видимому, MRP имеют два связывающих центра: один — высокоаффинный для лекарства, а второй — низкоаффинный для глутатиона. При этом низкоаффинного связывания недостаточно для перемещения глутатиона без субстрата. Только наличие субстрата и глутатиона делает возможным осуществление котранспорта.

Представленные данные свидетельствуют о большом разнообразии белков — переносчиков, осуществляющих транспорт лекарственных средств через биологические мембраны, приводящих, в конечном счете, к определенной биодоступности препаратов.

Отметим также наличие еще одной группы специфических переносчиков, ответственных за перемещение коротких пептидов и пептидомиметиков. Это белки, составляющие две их разновидности: PEPT1 (SLC15A1) и PEPT2 (SLC15A2). Они располагаются в плазматических мембранах и имеют близкую топологию. Такие белки транспортируют ди- и трипептиды, проявляя особую субстратную специфичность к пептидам, содержащим *L*-энантиомеры аминокислот. Среди лекарственных средств лигандами этой системы могут быть пептидомиметики (β -лактамные антибиотики, селективные ингибиторы пептидаз и протеаз). Детальная характеристика PEPT представлена нами в главе 9.

6.3.3.5. СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН

Сывороточный альбумин осуществляет макротранспорт лекарственных средств. Однако в связи с тем, что он непосредственно участвует на завершающей стадии всасывания (выход вещества в кровяное русло) и начальной — распределение по органам и тканям — мы дадим его молекулярно-биологическую характеристику в этом разделе.

Связывание лекарственных средств в плазме крови осуществляется преимущественно альбуминовой фракцией, составляющей 5 % ее состава. Наиболее изученными и часто применяемыми для исследований взаимодействия макромолекул с эндогенными и экзогенными веществами являются бычий (БСА) и человеческий (ЧСА) сывороточные альбумины [69, 70].

Молекула БСА образована из одной полипептидной цепи с асимметрией, соответствующей эллипсоиду диаметром 4 нм и длиной 12 нм. Молекулярная масса этого белка составляет 66 кД. Изоэлектрическая точка его находится в интервале 4,3—4,8 и зависит от метода ее определения. Всего альбумин имеет 180 титруемых зарядов на молекулу, которые определяют его большую электрофоретическую подвижность и степень растворимости.

Молекулярная масса ЧСА несколько выше, чем у БСА, и составляет 69 кД. Изоэлектрическая точка примерно одинаковая. В состав ЧСА входят 20 аминокислот и 35—37 титруемых SH-групп. При pH 7,3 молекула альбумина несет суммарный отрицательный заряд. Оба белка лабильны, и их структура зависит от концентрации водородных ионов, ультрафиолетового облучения, высоких температур и органических растворителей.

Взаимодействие между альбумином и лекарствами осуществляется за счет действия межмолекулярных сил, которые проявляются в изменении некоторых физических и физико-химических свойств молекул, образующих комплекс. Величина энергии связи такого комплекса не превышает 8—10 ккал/моль,

что указывает на существование «слабых связей» между макромолекулами и лекарствами. К таким связям относятся водородные, гидрофобные и ионные (раздел 3.1).

Способность альбумина связывать лекарственные препараты за счет образования тех или иных связей определяется химическими свойствами аминокислот и их расположением внутри макромолекулы. При рН 7,4 аминокислоты существуют в виде диполярных ионов и их заряды внутри таких молекул полностью разделены. Поэтому в плазме кислые и основные группы находятся в диссоциированном состоянии. В молекуле ЧСА 120 катионных и 97 анионных групп. В этом случае молекула альбумина несет суммарный отрицательный заряд, однако связывают белок предпочтительно аны. Это означает, что катионные группы в нем гораздо более доступны (раздел 2.1.2.). Данные свидетельствуют о том, что в молекуле ЧСА для одного препарата существует не одна, а несколько связывающих групп. Они могут быть одинаково эффективными, но существовать независимо друг от друга, или обладать различным сродством к лиганду, но действовать взаимно (раздел 3.2.).

Благодаря наличию единственного остатка триптофана в молекуле ЧСА стало возможным расшифровать один из центров связывания. С помощью спектральных методов исследования и путем частичного гидролиза белка установлена аминокислотная последовательность этого центра:

— Лиз — Ала — Три — Ала — Ала — Вал — Вал — Арг —.

Такая структура хорошо взаимодействует с кислыми лекарствами за счет гидрофобной связи и ароматическими группами и ионными связями с положительно заряженными группами лизина и аргинина.

Обычно такое связывание обладает высокой стабильностью.

Многие лекарственные средства конкурируют между собой и эндогенными субстратами за зоны связывания на молекуле альбумина. Это явление имеет особое биологическое значение

для веществ, теряющих свою активность в связанном состоянии. Обычно конкуренция соединения сопровождается вытеснением одного из них из зоны связывания. Это происходит потому, что одно лекарство в отличие от другого содержит в своей молекуле определенную группировку, увеличивающую его сродство к белку. Так, отмечено, что производные тетрациклина конкурируют за место связывания на альбумине с сульфазилэтазолом, а фенилбутазол, сульфаметоксипирадазин и ацетилсалициловая кислота вытесняют сульфамиды и пенициллин. Фенилбутазол к тому же вытесняет салициловую кислоту и толбутамид. Высокое сродство этого препарата к протеину позволило использовать его для повышения активности целого ряда химиотерапевтических средств. В частности, удалось повысить концентрацию свободного варфарина в плазме крови пациентов на 35—60 %, а отсюда его физиологическую активность на 40—80 %. Терапевтически весьма важным является вытеснение барбитуратов рядом лекарств, что приводит к увеличению концентрации их в головном мозге [69].

Среди природных соединений высокое сродство к альбумину имеют билирубин, тироксин, жирные кислоты и стероиды, которые конкурируют с синтетическими лекарствами за участие связывания на макромолекуле.

Билирубин связывается с ЧСА весьма интенсивно в том случае, когда на каждую молекулу альбумина приходится две молекулы пигмента. Большинство сульфамидных препаратов конкурируют с билирубином за место связывания на молекуле альбумина. В то же время сульфатазол, сульфаметазин не влияют на образование комплекса «билирубин—альбумин», так как сами имеют незначительное сродство к протеину. Жирные кислоты также вытесняют билирубин из белка, но в том случае, когда на 1 моль альбумина приходится 4 моля билирубина.

Основное количество тироксина связывается в плазме крови глобулинами (50 %) и преальбумином (30 %). Остальная часть гормона связывается сывороточным альбумином. Методами

равновесного диализа и флюоресценции установлено, что тироксин связывается с ЧСА в четырех его участках. В одном участке это связывание имеет высокое сродство ($1,3 \cdot 10^6$ М), в трех других меньшее ($6,0 \cdot 10^4$ М). Различные по своей структуре вещества конкурируют с тироксином. Аналоги гидантоина с одним или двумя фенилами или одной циклогексильной группой в положении 5 вытесняют тироксин из глобулина. Салицилат натрия и динитрофенол конкурируют с тироксином за преальбумин, а новобиоцин — за альбумин [70].

Стероиды обладают особо высоким сродством к белкам плазмы. Кортизол образует комплекс с α -глобулином с константой диссоциации $6 \cdot 10^8$ М, а при концентрации 10,2 мкг/мл и с сывороточным альбумином. Таким же сродством обладают тестостерон, эстрадиол, андростерон и сердечные гликозиды. Константа диссоциации комплекса «ЧСА — дигитоксин» составляет $9,6 \cdot 10^4$ М. Для такого взаимодействия $\Delta H = 3,54$ ккал/моль, а $\Delta S = 33,8$ ккал/моль, что свидетельствует о наличии гидрофобных связей между сердечным гликозидом и ЧСА. Дигоксин, отличающийся от дигитоксина наличием гидроксильной группы в положении 12 β , связывается с ЧСА с меньшей константой диссоциации ($9,0 \cdot 10^2$ М). Если связывание ЧСА с дигитоксином — эндотермическая реакция, то взаимодействие дигитоксина и ЧСА — экзотермическая ($\Delta H = -0,7$ ккал/моль) и вариация энтропии комплекса составляет 18,5 ккал/моль [71].

Незначительные количества жирных кислот находятся в связанном состоянии с альбумином в плазме крови. Жирные кислоты с длинной углеродной цепью взаимодействуют с альбумином в трех его участках. Первый участок состоит из трех зон, второй — из пяти и третий — из двенадцати. Константа диссоциации комплекса «олеиновая кислота—альбумин» составляет для первого участка $1,1 \cdot 10^8$ М. Связывание пальмитиновой кислоты альбумином достаточно хорошо изучено, и термодинамические константы рассчитаны ($\Delta H = -17,7$ ккал/моль; $\Delta S = -26,6$ ккал/моль). Отрицательное значение энтропии свидетельствует о том, что кроме электростатического взаимо-

действия между карбоксильной группой жирной кислоты и катионным участком макромолекулы существует и гидрофобная связь. Здесь же показано, что в ряду жирных кислот, от лауриновой до стеариновой, константа диссоциации увеличивается с удлинением углеродной цепочки.

Сульфамидные препараты конкурируют за участки связывания на альбумине с жирными кислотами, когда молярное их соотношение составляет 1:2.

Очевидно, сульфамидные препараты конкурируют с жирными кислотами только за второй и третий участки связывания в молекуле альбумина.

Важно отметить, что фармакологически активна только свободная, несвязанная часть препарата, а связанная с белком представляет собой биологически неактивное соединение, своеобразное депо. В большинстве случаев свободная и связанная фракции препарата находятся в равновесии: первая выводится из плазмы в процессе экскреции и пополняется в результате высвобождения из связанной формы. Образование и распад комплекса препарата с альбумином, за некоторыми исключениями, происходит довольно быстро.

В этой связи, определенное время принято было считать клинически важным взаимодействие лекарств за счет вытеснения из мест связывания с белками. Позже было доказано, что этот процесс не влияет на действие лекарств. В тоже время его наличие в таких процессах как распределение лекарств, а отсюда показатель — объем распределения (Глава 7) могут оказать существенное влияние на терапевтический эффект.

Несмотря на достигнутые успехи в изучении механизмов связывания альбумином лекарственных средств и причин, обуславливающих изменение их биологической активности, целый ряд важных вопросов остается нерешенным. Практически не установлено влияние лекарственных препаратов на конформацию молекулы альбумина. Тем не менее известно, что специфические физиологические реакции белков зависят от эффектов агрегации или определяются упорядоченностью

белков в твердой фазе. Понятно, что физиологическое функционирование белка всегда связано с его конформационным изменением [70]. В настоящее время еще не определено, как велики конформационные изменения альбумина при взаимодействии с лигандом. Однако анализ разнообразных реакций белков показывает, что смещения атомов в молекуле белка на 0,1 Å могут приводить к появлению новых свойств в его поведении. Очевидно, такого рода конформационные перестройки в молекуле сывороточного альбумина имеют место при его взаимодействии с лекарствами, что приводит к изменению функциональных особенностей макромолекулы и количества участков связывания на ней.

6.3.4. ТРАНСПОРТ ВОДЫ

Завершая анализ механизмов проницаемости клеток для различных лекарственных средств необходимо указать на чрезвычайно важную роль воды в осуществлении этих процессов. Имеется в виду ее растворяющая способность (раздел 2.1.1), а также поддержание постоянного объема клеток.

Вода проникает через мембрану почти в 50 раз быстрее, чем этого можно было бы ожидать, исходя из количества образуемых ее молекулами водородных связей. Возможно, однако, что структура воды несколько отличается от структуры большинства других растворов, поскольку ее концентрация в растворе исключительно высока (приблизительно 55 М). Следовательно, вероятность взаимодействий между молекулами воды, приводящих к образованию димеров или других ассоциатов, много выше, чем этого можно было бы ожидать от растворов более низкой концентрации.

Однако быстрое проникновение воды через мембрану всегда служит веским доказательством в пользу существования в мембране пор.

Разумно предположить, что поток воды, вызванный в пористой мембране действием осмотических сил, аналогичен тому, который бы возник при приложении гидростатического давления к столбу воды, заполняющему пору. Рассмотрим мембрану, которая отделяет чистый растворитель от раствора, содержащего молекулы растворенного вещества. Стенки поры будут предохранять движущиеся через нее молекулы воды от бомбардировки молекулами растворенного вещества, что создает осмотическое давление. Следовательно, молекулы воды в поре, расположенные ближе к той стороне мембраны, которая контактирует с раствором, будут находиться под меньшим гидростатическим давлением, чем молекулы, расположенные ближе к той стороне, которая обращена к чистому растворителю. Движение молекул чистого растворителя полностью передается молекулам, находящимся внутри поры, что и приводит к установлению разности гидростатического давления (разность эта обусловлена различиями в концентрации воды, каждой из которых соответствует определенная величина гидростатического давления). Таким образом, данная модель позволяет объяснить тот факт, что поток воды, обусловленный, действием осмотических сил, приблизительно в 2,4 раза больше диффузионного потока; эти данные позволяют также вычислить эффективный диаметр поры, который оказался равным 0,35 нм.

Сопоставляя скорости проникновения через мембрану различных молекул растворимых веществ по сравнению с водой, можно выяснить, в какой мере эти величины согласуются с определенным выше диаметром поры. (Для этого необходимо рассчитать тот диаметр поры, который позволяет удовлетворительно объяснить наблюдаемую в эксперименте скорость движения молекул через мембрану). При проведении такого сравнения оказалось, что размер поры завышен. Хотя результаты дают большой разброс, вероятнее всего, что средний диаметр пор составляет от 0,2 до 0,3 нм (подавляющее большинство данных указывает на диаметр, равный 0,28 нм). Таким образом, для того, чтобы удовлетворительно объяснить наблюдаемый

перенос веществ через мембрану, необходимо предположить существование в ней пор с различными диаметрами. Вместе с тем есть все основания считать, что небольшие молекулы могут приходить и через большие поры.

Не исключена возможность, что в мембранах клетки не существует стабильных пор, а они могут быть короткоживущими. Они могут возникать, например, вследствие действия на мембрану тепловых флуктуаций. Поскольку взаимодействие молекул воды между собой сильнее их взаимодействие с липидными молекулами, они переносятся через мембрану не поодиночке, а целыми порциями; проникая через липидную решетку, эти порции как бы создают в ней короткоживущие поры (раздел 6.3.1). Это означает, что внутри липидной решетки все время образуются и исчезают ячейки, т. е. происходит процесс, обеспечивающий перемещение через нее водных агрегатов. Такой механизм может быть назван «капельным» переносом [72].

В последнее время проникновение через бислойный слой мембраны мелких полярных веществ и особенно воды связывают с образованием между жирнокислотными хвостами фосфолипидных молекул при их тепловом движении небольших свободных полостей-кинков (kink — петля), образованных *гош-транс-гош*-конфигурациями липидов. Вследствие теплового движения кинки могут перемещаться поперек мембраны и переносить попавшие в них молекулы воды.

Проницаемость ионных каналов для молекулы воды составляет около 1 % от общей суммы. Высокая проницаемость плазматической мембраны эритроцитов, почечного эпителия, некоторых клеток глии связана с наличием специфических белков аквапоринов [52]. Они представляют собой распространенное семейство канальных белков с избирательной проницаемостью для воды, а в некоторых случаях для таких небольших молекул как мочевины и глицерол.

6.3.5. ЦИТОЗ

Наряду с диффузией и транспортом веществ и ионов, осуществляемым переносчиками, в клетке существует особый механизм — цитоз. Он предназначен для поглощения клеткой и выведения из нее больших молекул с помощью изменения формы мембран. По механизму цитоза клетка может поглощать высокомолекулярные вещества типа белков, целые бактерии, а также выделять в среду ферменты, гликопротеины и продукты метаболизма.

Если размер поглощаемых веществ более 1 мкм, то такой процесс называют фагоцитозом. Поглощение более мелких веществ называется пиноцитозом.

В организме с помощью фагоцитоза лейкоцитами и макрофагами поглощаются бактерии и твердые частицы, а с помощью пиноцитоза происходит поглощение макромолекул в пищеварительном эпителии, систем эндотелия, полиморфоядерных лейкоцитов. На первой стадии цитоза вещества или частицы абсорбируются поверхностью мембраны. Этот процесс происходит без затрат энергии. Следует отметить, что уже на этой стадии вещество не возможно отделить от мембраны промыванием клетки. На следующей стадии мембрана с веществом углубляется в цитоплазму. Образовавшиеся при этом локальные впячивания плазматической мембраны отшнуровываются от поверхности клетки, образуя пузырьки, которые затем могут проникать в глубь клетки. Так как этот процесс ингибируется цитохалазином, он связан с системой микрофиламентов и является энергозависимым. Поступившие в клетку пузырьки могут сливаться с лизосомами, образуя фаголизосомы, в которых гидролитические ферменты лизосом расщепляют плазматическую мембрану. До сих пор не ясно, почему гидролитические ферменты, содержащиеся в лизосомах, не оказывают своего разрушительного действия на собственные мембраны [40, 52].

Большинство секретирующих клеток осуществляет выделение макромолекул в межклеточное пространство по механизму

экзоцитоза, который также является энергозависимым. Он ингибируется цитохалазином, что подтверждает его связь с микрофиламентами, и в то же время чувствителен к действию колхицина и, следовательно, связан с микротрубочками. Выделение содержимого секреторных гранул регулируется сложным механизмом, обеспечивающим сопряжение между возбуждением клеток и секрецией вновь синтезированных в ней белков, благодаря повышению внутриклеточной концентрации ионов кальция. Так, например, выделение ацетилхолина из синаптических пузырьков в нервных окончаниях происходит в результате поступления Ca^{2+} из внешней среды по специфическим Ca^{2+} -каналам, которые открываются при деполяризации мембраны.

Рассмотренные кинетические процессы передвижения лекарственных средств относятся к обобщенной и изолированной от других структур клетке.

Однако все органы и ткани образованы огромным числом клеток. Поэтому существует не только внутриклеточное, но и межклеточное распределение (перераспределение) веществ. Последнее подразумевает перенос соединений из клетки в клетку. В настоящее время этот вопрос, скорее всего, можно отнести к теоретическим, исходя из его сложности. Тем не менее, в будущем, на основании экспериментальных данных, возможны весьма полезные выводы и для практики.

В классической биохимии известно много случаев, когда одна клетка (например, клетки задней доли гипофиза) выделяет биологически активные вещества (гормон), а другая (клетка семенников) поглощает его. В этом случае такой процесс можно рассматривать как один из случаев активного транспорта высокомолекулярного соединения через плазматическую мембрану. Однако здесь мы имеем дело с переносом веществ на «большие» расстояния и каждая клетка рассматривается как независимая единица. Клетки при этом непосредственно не общаются друг с другом; одни из них выделяют определенные вещества в среду, другие поглощают их. Несомненно, в тканях имеет место активный транспорт веществ непосредственно из

клетки в клетку. В исследованиях, проведенных на культуре тканей, перенос веществ между клетками, образующими большие скопления, может происходить с очень большой скоростью. Этот факт уже давно привел к предположению, что в определенных участках контактирующих клеток какой-либо барьер вообще отсутствует [72].

Действительно, если две плазматические мембраны тесно соприкасаются между собой, то в некоторых местах их поры могут совместиться так, что небольшие молекулы получают возможность переходить из одной клетки в другую путем диффузии. Эти предположения имеют свое подтверждение данными электронной микроскопии. Изучение электронных микрофотографий показывает также наличие выступов в плазматических мембранах, которые проникают через наружные покровы соседней клетки, что обеспечивает непосредственный контакт их плазматических мембран. Такое слияние мембран может приводить к образованию свободных проходов, соединяющих клетки, которые в этих условиях будут вести себя так, если бы они были единым целым.

Когда мембраны тесно прилегают друг к другу, они могут превращаться в двойную мембрану. Проницаемость такой двойной мембраны примерно такая же, как и одиночной, поскольку переход растворенных веществ не сопровождается выходом в водную среду, разделяющую клетки и новым поступлением в липидную фазу второй клетки. Совершенно очевидно, что барьер, создаваемый двойной мембраной для всех веществ, кроме воды, должен быть таким же, как и одиночной.

В то же время, если смежные клетки не образуют контакты, то возникает вопрос о существовании конкуренции между ними за вещество, которое однонаправленно транспортируется из окружающей среды. Очевидно, в норме этого не происходит, так как не наблюдается беспорядочного роста клеток, который может происходить в этом случае.

Следовательно, в местах контактов между клетками происходит такая реорганизация плазматической мембраны, которая обеспечивает упорядоченный транспорт веществ между клетками.

Приведенное выше обсуждение с достаточной убедительностью показывает, что свойства отдельных клеток не могут быть положены в основу весьма сложных межклеточных взаимоотношений. Однако наблюдаемые при контакте новые явления должны представлять собой лишь видоизменения тех основных свойств, которые характерны и для отдельно взятых клеток.

Закljučая анализ кинетики транспорта лекарств в клетке необходимо отметить, что общее их количество в организме взрослого человека оценивается приблизительно в 100 триллионов. Очевидно, рассматривая организм как некоторый уровень организации клеток, мы не в состоянии не только описать процесс распределения лекарства по такой системе, но даже мысленно представить его. Поэтому в фармакокинетике принято выделять в качестве единиц системы камер. Это название условно, так как за ним не скрывается какого-либо анатомического смысла. Тем не менее, даже в таких излишне формализованных системах учтены фундаментальные основы взаимодействия клетки и лекарства (Глава 10).

6.4. ОСОБЕННОСТИ ВСАСЫВАНИЯ ЛЕКАРСТВ, ЗАВИСИМЫЕ ОТ ПУТИ ИХ ВВЕДЕНИЯ

Пути поступления (введения) лекарств определяют в организме место всасывания. Как правило, пользуются одним из следующих путей введения: энтеральным или букальным, ректальным, парэнтеральным, внутримышечным, подкожным, ингаляционным и трансдермальным. Отсюда особенности процессов всасывания и сопряженная с ними элиминация (рис. 5.1).

Независимо от путей поступления препарата, скорость его всасывания определяется: лекарственной формой (таблетки, свечи, аэрозоли), растворимостью и кровотоком в месте введения.

Наиболее часто лекарства поступают в организм пациента через полость рта, желудочно-кишечный тракт, кожу и легкие. С ними, практически, и связано понятие всасывания.

6.4.1. ПОЛОСТЬ РТА И ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫЙ ТРАКТ

Слизистая оболочка *полости рта* отличается обильным кровоснабжением, непосредственно связанным системным кровотоком, поэтому действие нитроглицерина или нифедипина может наступить быстро. Это объясняется тем, что эти препараты всасываются из рта посредством диффузии в слизистую оболочку и оттуда в кровеносную систему.

Если слюна вырабатывается в небольших количествах, то она обладает слабокислой реакцией, если же слюна обильно секретится, то реакция слабощелочная (рН 5,8—7,8). Следовательно, слюна практически не влияет на физико-химические свойства препарата. Более того, вещества, всосавшиеся из рта, не подвергаются воздействию желудочно-кишечных пищеварительных соков и, кроме того, не поступают непосредственно в печень, как это происходит при всасывании из желудка и кишечника. Так как метаболизм лекарств осуществляется главным образом в печени, всасывание из рта задерживает начало модификации молекулы и может продлить активность препарата.

Желудочно-кишечный тракт относится к наиболее важной области, в которой всасываются лекарства. Различные отделы желудочно-кишечного тракта (*желудок, тонкая и толстая кишки*) отличаются друг от друга величинами рН среды, свойствами поверхностного эпителия, составом ферментов, а отсюда способностью к абсорбции различных лекарственных средств. Желудочный сок человека имеет в норме рН 1—3, в двенадцатиперстной кишке 5—6, а в толстом и тонком кишечнике около 8.

Поскольку через мембраны эпителия пищеварительного тракта проникают лекарства в ионизированной форме, ясно, что кислотные препараты будут лучше всасываться из желудка, а основные — в кишках. В тоже время небольшие нейтральные молекулы, например спирт и вода хорошо всасываются из желудка.

Слизистая *желудка* обычно покрыта однослойным высоким плазматическим эпителием, на поверхности которого лежит слой слизи, выделяемой эпителиальными клетками. Внутренняя поверхность желудка усеяна небольшими ямками, в глубине которых открываются желудочные железы. Эти железы лежат в соединительной ткани и имеют различное строение в разных частях желудка. В самом переднем и самом заднем отделах — кардинальной области и привратнике — трубчатые железы (мукоидные эпителиальные клетки). Железы дна и тела желудка состоят из клеток нескольких типов. В базальной трети железы преобладают так называемые главные клетки с хорошо развитой эндоплазматической сетью. Ацидофильные обкладочные клетки находятся главным образом в средней и верхней частях железы. Вообще долгое время считалось, что за исключением этилового спирта всасывание из желудка является незначительным. Это в некоторой степени справедливо для питательных веществ, для которых требуется пищеварение. Но теперь известно, что многие лекарственные вещества легко всасываются из желудка путем простой диффузии неионизированных молекул через слизистую оболочку. Так, наблюдения показали хорошее всасывание из желудка человека и крыс различных кислотных соединений, таких как салициловая кислота, барбитураты и аспирин. Однако высоко ионизированные сульфокислоты (сульфосалициловая кислота), некоторые основания (хинин и амидопирин), которые значительно ионизируются при pH среды желудка, не всасываются [73]. Следовательно, такое всасывание является функцией растворимости соединения в липидах и прямопропорционально концентрации раствора в желудке. У крыс сульфаниламин и сульфатиозол

всасываются посредством другого механизма, вероятно, фильтрацией через водные поры эпителия желудка.

Тонкий кишечник представляет собой основной отдел в котором всасываются питательные вещества, а также большинство лекарств, принимаемых внутрь. Он специально предназначен для выполнения этой функции и отличается существенными особенностями. Длина тонкого кишечника в целом у человека составляет около 2,8 м (30 см — двенадцатиперстная, 120 см — тощая, 130 см — подвздошная). Ему характерна большая поверхность (200 м²). Такая большая величина, обусловлена главным образом наличием круговых, керкринговых складок, ворсинок и микроворсинок. Благодаря ритмичным сокращениям ворсинок улучшается контакт их поверхности с химусом и, кроме того, выдавливается лимфа из слепых концов проходящих в ворсинках лимфатических капилляров.

Процессы ферментативного превращения субстратов (пищевых веществ и лекарств) и их всасывания происходят в энтероцитах, состоящих из мельчайших выростов — микроворсинок, имеющих в длину 1 мк и в ширину 0,1 мк. Апикальная мембрана энтероцитов хотя и имеет классическое трехслойное строение, существенным образом отличается от латеральных и базальных, так и других мембран [36].

Прежде всего мембрана микроворсинок имеет большую толщину, чем базолатеральные мембраны — 9,5—11,5 нм и 7—9 нм соответственно. Утолщение апикальной мембраны, по-видимому, связано с равномерным расширением всех ее слоев. До сих пор биологическая значимость этого феномена не представляется окончательно ясной, хотя утолщение апикальной мембраны энтероцитов может быть следствием расположения в ней большого числа гидролитических и транспортных ферментов.

Другим отличительным признаком мембраны микроворсинок является наличие гликокаликса, располагающегося снаружи мембраны и состоящего из тончайших нитей мукополисахаридов. Толщина гликокаликса в среднем составляет около 0,3 мк.

Как интегральная часть энтероцитов гликокаликс выполняет целый ряд важных функций: предупреждает проникновение на поверхность мембраны крупных частиц и бактерий, детерминирует иммунологические свойства энтероцитов, участвует в процессах расщепления олиго- и димеров, размеры которых достаточны для прохождения пористой структуры гликокаликса.

В кишечнике молекулы пищевых субстратов в процессе последовательного гидролиза претерпевают существенные физико-химические превращения, уменьшаются в размерах и достигают мембран микроворсинок, где осуществляются процессы терминального гидролиза и транспорта, возможные благодаря особой морфофункциональной организации мембран микроворсинок, энзиматические и транспортные компоненты которых представляют собой мультипротеиновые комплексы, как бы вмонтированные в наружном и внутреннем слоях апикальной мембраны энтероцитов. К настоящему времени в мембранах микроворсинок кишечника определяется около 50 белков, выполняющих каталитическую (ферменты) и транспортную функции.

Существуют три барьера, которые лекарственные вещества преодолевает в следующем порядке: сначала мембрана клетки эпителия, обращенная в просвет кишечника, затем мембрана этой же клетки, обращенная к капиллярам и, наконец, базальная мембрана капилляра.

Как уже указывалось ранее, в среднем рН в тонком кишечнике выше, чем в желудке, поэтому из тонкого кишечника возможно всасывание ароматических, но не алифатических аминов, обладающих более выраженными основными свойствами. Отмечается также, что всасывание жирорастворимых лекарств с высокой молекулярной массой в тонком кишечнике происходит быстрее, чем всасывание водорастворимых соединений. Из этого следует, что всасывание лекарственных средств из тонкого кишечника происходит через участки с высоким содержанием липидов, а не через водные каналы. С повышением рН всасывание оснований усиливается, а всасывание кислот

Таблица 6.1

Всасывание веществ из тонкого кишечника [74]

Соединение	pK_a	Процент всасывания
основания		
мета-нитроанилин	2,5	76
анилин	4,6	53
хинин	8,4	13
эфедрин	9,6	4
тетраэтиламмония гидроксид	> 12	0
кислоты		
сульфациловая	1 <	0
5-нитросалициловая	2,3	6
салициловая	3,0	30
4-оксипропифенон	7,8	60

уменьшается, т. е. этот процесс определяется константами диссоциации этих веществ (табл. 6.1).

Скорость всасывания ионов из тонкого кишечника незначительная и с течением времени падает.

Всасывание природных соединений (аминокислот, глюкозы, урацила) из тонкого кишечника происходит с участием активных транспортных систем. Этим же путем транспортируются в плазму крови из тонкого кишечника и некоторые лекарства (фторурацил, неприродные сахара и аминокислоты).

Следует отметить, что процесс всасывания лекарств из тонкого кишечника сильно варьирует, т. к. в значительной степени зависит от биологических факторов. К ним относится разрушение лекарственного вещества (бензпеницилина) желудочным соком, нарушение всасывания в результате усиленной перистальтики кишечника, особенности взаимодействия препаратов с пищей, желудочно-кишечная секреция, присутствие других веществ [73].

Некоторых из перечисленных факторов можно избежать путем ректального применения соответствующих лекарственных средств. Несмотря на то, что слизистая оболочка *прямой кишки* не является участком для всасывания природных соединений она отличается обильным кровотоком и разветвленной лимфатической системой. Оказалось, что многие препараты хорошо всасываются из прямой кишки. Для некоторых из них наблюдались практически сходные фармакокинетические параметры при пероральном и ректальном введении.

В зависимости от участка всасывания из прямой кишки лекарства неоднородны. Одни из них всасываются из нижних отделов прямой кишки в нижние геморроидальные вены, впадающие в венозную систему. Другие поступают в системный кровоток через верхние отделы прямой кишки, проходят через верхние геморроидальные вены и предварительно попадают через воротную вену в печень. Следовательно, в этом случае не удастся избежать процессов метаболизма лекарств при первичном прохождении через печень.

С точки зрения кинетических и физико-химических основ процессов всасывания лекарств из прямой кишки — они аналогичны процессу, происходящему в тонком кишечнике.

Учитывая тот факт, что в фармакотерапии используется не одно, а несколько лекарственных средств, необходимо учитывать возможность их *взаимодействия* (конкурентных) в процессе всасывания. Различают два вида взаимодействия препаратов [75]. К первому относится *физиологический механизм*, который лежит в основе увеличения всасывания дикуморала в условиях одновременного введения с трициклическими антидепрессантами. В его основе лежит способность (холинэргическая) последних снижать скорость прохождения дикумарола по кишечнику, увеличивая контакт со слизистой оболочкой. Тот же механизм ответствен за понижения всасывания дигоксина под влиянием метоклопромида, который повышает скорость прохождения препаратов в зоне активного всасывания. Такое замедление скорости прохождения препаратов

по желудочно-кишечному тракту может быть полезным только в том случае, когда они устойчивы к воздействию ферментов или микрофлоры.

Второй является собой *химический механизм*, заключающийся в изменении физико-химических свойств одного препарата под воздействием другого. Примером может служить уменьшение всасывания антикоагулянтов (кумарина) при взаимодействии с антицидами (гидроокись алюминия). В этом случае гидроокись аммония способствует ионизации кумарина, являющегося слабой кислотой, а как указывалось ранее, это приводит к существенным изменениям проницаемости. Если в кишечнике одновременно находятся сульфат железа и карбонат кальция, то они оба практически не всасываются, так как образуют нерастворимую соль.

6.4.2. КОЖА

Кожа относится к естественным барьерам, препятствующим поступлению в организм ксенобиотиков. Площадь ее поверхности у взрослого человека около 2 м², причем объем регионального сосудистого русла кожи составляет приблизительно 1/3 объема кровотока.

Кожа состоит из богатого клетками эпидермиса с роговым слоем и базальными клетками и из бедного клетками корiumsа с различными структурными элементами и кровеносными сосудами. Затем располагается подкожный слой с жировыми клетками и, наконец, мышечная ткань.

Эпидермис состоит из пяти слоев и наружный (роговой) непосредственно граничит с окружающей средой. Роговой слой состоит из нескольких частей, которые представляют собой компактно расположенные, содержащие мало влаги и значительно кератинизированные клетки.

Основным барьером для поступления лекарств через кожу является роговой слой эпидермиса. Он пронизан протоками

потовых и сальных желез и волосяными фолликулами. В среднем на 1 см² поверхности кожи имеется 40—70 волосяных фолликул и 200—250 отверстий потовых желез.

Несмотря на успехи, достигнутые в связи с разработкой трансдермальных терапевтических систем и исследованием проницаемости кожи нельзя определенно сказать, какие структурные элементы кожи являются барьерами для тех или иных лекарственных средств. Не исключена возможность, что для осуществления барьерной функции рогового слоя важны кератин, граница роговых клеток и межклеточное пространство. Следовательно, кожу можно представить как комплекс различных барьеров, а отсюда свойств и любое лекарство, проникающее через эти границы в зависимости от его химических и физических характеристик всасываются различными способами [76]. Отсюда возможны три варианта путей всасывания лекарственных веществ через кожу. Первый — *трансэпидермальный*, осуществляемый через эпидермис, который включает проникновение молекул между клетками и сквозь клетки рогового слоя. Второй — *трансграндулярный*, способствующий транзиту через протоки сальных и потовых желез. Третий — *трансфолликулярный*, дающий возможность веществу поступать в кровеносное русло непосредственное через стенки фолликул. Последний путь наиболее доступен для процесса поступления лекарства через кожу, так как он имеет наименьшие препятствия с точки зрения анатомического строения фолликул. За счет этого обеспечивается высокая постоянная диффузия. Для поступления гидрофильных веществ используются поры потовых желез, а для гидрофобных — выводы сальных желез. В связи с тем, что количество каналов в коже незначительно, основную роль в транспорте лекарств через кожу играет трансэпидермальный путь, способствующий равномерной диффузии, скорость которой пропорциональна концентрации активного вещества.

Что касается физико-химических свойств лекарств, то они играют значительную роль в преодолении барьерных структур

кожи. Липофильные вещества проникают через кожу быстро, в то время как ионы и гидрофобные соединения проникают очень медленно, минуя липидный барьер эпидермиса, через волосяные луковицы и сальные железы. Молекулярная масса низкомолекулярных веществ практически не влияет на их биодоступность.

Как и при других способах введения лекарств, чрезкожное также чувствительно ко многим факторам, лимитирующим их всасывание. К ним относится: концентрация проникающего вещества в растворителе, размер проникающих молекул, характер растворителя, который воздействует на проникающее вещество и кожный барьер, температура, различное повреждение ороговевшей части эпидермиса и функциональное состояние кожи [77].

6.4.3. ЛЕГКИЕ

Ранее нами рассмотрены процессы всасывания лекарственных веществ, характеризующихся их общим свойством, т. е. все они представлены растворами. В этом отношении легочная ткань отличается не только строением клеток, образующих ее, но и физическим состоянием лекарств, с которым она контактирует. Ингаляционный путь введения характерен прежде всего для некоторых общих анестетиков. Сюда относятся газы (закаись азота) и летучие жидкости (галотан, энфлуран, метоксифлуран).

Особую лекарственную форму также представляют лекарственные аэрозоли [78]. Они используются для применения терапевтически активных компонентов в виде измельченных твердых частиц или туманоподобных жидкостей для лечения органов дыхания (например, β -адреномиметики в качестве бронходилаторов).

В большинстве случаев при ингаляционном пути введения лекарств они в газообразном виде смешиваются с вдыхаемым

воздухом и попадают в легкие. Газообмен между легкими и кровью осуществляется в альвеолах. Они тесно прижаты друг к другу, капилляры, оплетающие их одной своей поверхностью граничат с одной альвеолой, а другой — с соседней. Это обеспечивает оптимальные условия газообмена. Границу между кровью, протекающей по кровеносным капиллярам и воздухом, заполняющим полости альвеол, составляет эндотелий капилляра, его пограничная мембрана, альвеолы и альвеолярный эпителий. Обе пограничные мембраны могут сливаться в одну. В местах прилегания капилляров барьер между кровью и воздухом истончен за счет значительного уменьшения слоя цитоплазмы альвеолярных и эндотелиальных клеток. На долю тонкой части барьера (кровь—воздух) приходится 60 % всей площади альвеол. Эта часть барьера является местом наиболее интенсивного газообмена. Количественная сторона газообмена описывается законом диффузии Фика (раздел 6.3.1).

К особенностям переноса анестетиков из альвеол в артериальную кровь относится способность газов растворяться в крови. В этом случае коэффициент распределения кровь—газ может быть низким, например 0,5 — для закиси азота или 10 у препаратов типа метоксифлурана. Когда плохо растворимый в крови анестетик диффундирует из легких в кровь, требуется всего несколько молекул и, соответственно, немного времени для повышения его парциального давления. Наоборот, в случае хорошо или средне растворимых анестетиков для значительного повышения парциального давления нужно больше молекул и, следовательно, больше времени [79].

Для органических веществ, используемых в качестве лекарств в виде растворов всасывание из легких в кровь и наоборот подчиняется тем же закономерностям, что и для других тканей.

6.5. ИНТЕГРАЦИЯ ФЕРМЕНТНЫХ И ТРАНСПОРТНЫХ СИСТЕМ

Ферментный и транспортный аппарат микроворсинки привлекает все большее внимание не только исследователей в области мембранного пищеварения, но и биофармацевтов. Объясняется это тем, что мембранное пищеварения обеспечивает особую интеграцию собственно пищеварительных и транспортных процессов.

Напомним, что под всасыванием понимается совокупность процессов, обеспечивающих переход веществ из полости тонкой кишки в жидкости внутренней среды (кровь и лимфу). Предполагается, что высокая эффективность пищеварительно-транспортного конвейера может быть достигнута на этапе передачи продуктов реакции с фермента на вход транспортной системы. Теоретически мыслимы два основных принципа передачи конечных продуктов гидролиза с фермента на вход транспортной системы: 1) образующиеся при гидролизе вещества после диссоциации комплекса фермент—субстрат попадают в водную фазу, откуда путем диффузии вторично поступают на ту же поверхность, где локализованы соответствующие переносчики; 2) вещества передаются или непосредственно с фермента на переносчик, или через промежуточную (адапторную) молекулу без выхода в водную фазу. Следует отметить, что высокая эффективность пищеварительно-транспортного конвейера лучше согласуется со вторым предположением.

Итак, мембранное пищеварение является основным механизмом промежуточных и заключительных стадий гидролиза. В связи с тем, что гидролиз завершается, а транспорт начинается на одной и той же поверхности, оба эти процесса максимально сближены в пространстве и во времени, что достигается также благодаря специальной организации пищеварительных и транспортных функций клеточной мембраны. Эта интегрированная система была названа пищеварительно-транспортным конвейером.

Поисками аналогичного конвейера заняты исследователи, работающие в различных областях системы ADME. В этом случае интеграция ферментных и транспортных систем лекарств может осуществляться, во-первых, при их наличии и, во-вторых, при определенной синхронизации их действия.

Ранее (раздел 6.3.3.1.) нами дана характеристика белкам-переносчикам, обеспечивающим передвижение лекарств. Имеются сведения и о том, что пищеварительная система содержит и ферменты, катализирующие различные реакции метаболизма лекарств (Глава 8). Следует отметить, что кишечник является вторым после печени, по значимости органом метаболизма лекарственных средств. В стенке кишечника осуществляются реакции первой и второй фаз метаболизма. Более того, уже доказана значительная роль метаболических превращений лекарств в стенке кишечника в эффекте первичного прохождения (пресистемного метаболизма) таких препаратов как циклоспорин А, нифедепин, мидазолам, верапамил [80].

Среди ферментов первой фазы метаболизма лекарств особое положение занимает суперсемейство цитохрома Р450 (СYP). Основная изоформа этого гемопротейна представлена СYP3A4, количество которого в тонком кишечнике составляет половину, находящегося в печени [81]. Установлена четкая зависимость содержания СYP3A4 от отделов кишечника. Наибольшее его количество содержится в двенадцатиперстной кишке, несколько ниже — в тощей и совсем незначительно — в подвздошной. Около 10—20 % печеночной активности СYP2D обнаружено в кишечнике. Представленные гемопротейны в стенке кишки являются менее индуцибельными, чем в печени.

В обзорной статье [43] суммированы многочисленные данные, свидетельствующие о синхронном действии в стенке кишечника СYP3A4 и *P-gp*. Высказаны предположения о том, что обе системы являются лимитирующей стадией проникновения соответствующих веществ через биологические мембраны. Они основаны на следующих фактах. Во-первых, многие лиганды *P-gp* одновременно являются субстратами СYP3A4.

Во-вторых, оба белка имеют более чем одно место связывания. В-третьих, экспрессия генов обоих белков в различных отделах кишечника — идентична. Таким способом достигается определенный круговорот субстратов, позволяющий более надежно их метаболизировать в стенке кишечника. Синхронность действия CYP3A4 и *P-gp*, несмотря на незначительное содержание гемопroteина, позволяет более полно извлекать из клетки транспортирующие лекарства. Благодаря взаимодействию этих белков осуществляется эффект первичного прохождения лекарств и, как следствие, наблюдается нелинейный характер фармакокинетических показателей. Кроме того, они способны вступать во взаимодействие с рядом других субстратов и ингибиторами.

Вторая группа, взаимодействующих белков может быть представлена УДФ-глюкуронозилтрансферазой (UGT) и MRP. Физиологическая функция UGT — образование глюкуронидов эндогенных соединений и лекарств [82]. В тоже время MRP являются переносчиками глюкуронидов (раздел 6.3.2.1).

Еще одним источником ферментных систем, играющим определенную роль в сопряженных транспортных процессах может быть кишечная микрофлора [83, 84].

Различные микроорганизмы составляют микрофлору пищеварительного тракта человека и животных. В основном это — анаэробные формы: энтеробактерии, энтерококки, стрептококки, стафилококки, дрожжи, молочные бактерии, бактериоиды, бифидобактерии и клостридии. Распределение микроорганизмов в различных участках желудочно-кишечного тракта неодинаково. В желудке микрофлора ограничена благодаря действию желудочного сока. Немногочисленна она и в тонких кишках. Особенно богата и разнообразна флора в толстых кишках. Однако локализация микроорганизмов вдоль пищеварительного тракта варьирует у различных видов животных и человека (табл. 6.2).

У человека и кролика незначительное количество микроорганизмов встречается в желудке и проксимальном отделе тонкого кишечника. Основное количество микрофлоры у человека

Таблица 6.2

Количество микроорганизмов (lg организмов на 1 г сырой массы)
в желудочно-кишечном тракте человека и различных видов животных

Участок тракта	Человек	Кролики	Морские свинки	Крысы	Мыши
Желудок	0—5	0—6	5—6	7—9	7—9
Тонкий кишечник:					
проксимальная часть	0—5	0—5	5—6	7—8	7—9
дистальная часть	6—7	6—7	6—7	7—8	7—8
Толстый кишечник	7—10	8—9	8—9	8—9	8—9
Прямая кишка	10—11	9—10	9—10	9—10	9—10

и кроликов находится в толстом кишечнике и прямой кишке, в то время как у крыс, мышей и морских свинок она равномерно распределена вдоль всего желудочно-кишечного тракта.

В кишечнике животных ксенобиотики претерпевают метаболические превращения, которые катализируются ферментами микроорганизмов. На основании химической природы их можно классифицировать как реакции гидролиза, восстановления, синтеза и др.

Из всех систем организма, метаболизирующих лекарства, наиболее сложная и малоизученная связь между ферментами микрофлоры кишечника и слизистой. В кишечном тракте практически нет стерильных участков, и число микроорганизмов увеличивается от тонкого кишечника к прямой кишке. Между отдельными участками пищеварительного тракта имеются и качественные отличия, а некоторые штаммы микроорганизмов живут в слизистом слое.

Исследования, проведенные на крысах, выращенных в стерильных условиях, показали, что микроорганизмы кишечника играют существенную роль в регуляции процессов метаболизма в кишечнике. Активность щелочной фосфатазы, АТФазы и мальтазы в тонком кишечнике этих животных почти в два раза выше, чем у обычных крыс. Скорость глюкуронидной конъюгации

в двенадцатиперстной кишке у первых животных также намного больше, чем у вторых. Объясняется это конкуренцией между УДФ-глюкуронозилтрансферазами слизистой и β -глюкуронидазой микроорганизмов. Микрофлора кишечника заметно не влияет на скорость и направление метаболизма в печени и легких, поскольку активность ферментов названных тканей одинакова у обычных крыс и животных, выращенных в стерильных условиях.

В целом же для кишечной микрофлоры главные пути трансформации ксенобиотиков — гидролиз и восстановление, в то время как для тканевых ферментов — гидроксилирование и синтез. Такое разделение химических процессов, обезвреживающих организм от чужеродных соединений, повышает возможность конкуренции разнообразных ферментов за субстрат. Несмотря на существенные различия в метаболизме ксенобиотиков, осуществляемых микрофлорой кишечника и тканевыми ферментами, многие вещества могут служить субстратами для тех и других ферментативных систем. Тем не менее, в последнее время установлено, что ферменты микрофлоры катализируют только для них характерные реакции. Примером может служить расщепление цикламата до циклогексиламина, дегидроксилирование гомопротокатеховой кислоты, гидроксилирование фенилаланина и др.

К ферментно-транспортному конвейеру могут быть отнесены и молибден-зависимые оксигеназы (ксантиноксидаза и альдегидоксидаза), а также переносящие белки NT, использующие одни и те же вещества в качестве субстратов и лигандов.

6.6. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ВСАСЫВАНИЯ ЛЕКАРСТВ

Несмотря на значительные успехи в области кинетики и ферментативного катализа, макро- и микробиотранспорта, используемых для объяснения механизмов всасывания лекарственных

средств, количественная оценка этого процесса все еще остается проблематичной. Однако для направленного создания лекарственных форм, на основании их физико-химических свойств, с одной стороны, и биодоступности, с другой, необходимо, чтобы эта зависимость была выражена аналитически, т. е. имела вид формулы. Для этой цели необходима адекватная поставленным задачам количественная оценка всасывания лекарств.

Как мы уже указывали ранее, всасывание — это процесс, обеспечивающий транспорт лекарств с места введения в кровеносное русло. В процессе такого перемещения (массопереноса) вещества необходимо учитывать один из главных показателей — уменьшение его концентрации, например, в кишечнике (прием лекарств внутрь) или увеличение в крови. Аналитически такая процедура не составляет больших трудностей. Проблема в другом, — в химической кинетике (газы, растворы) строго указаны границы отсеков, где из одного из них, в течение определенного времени, вещество перемещается в другое. В этом отношении более удобно работать с клеткой, так как она представляет собой строго изолированное пространство (отсек).

Поэтому с кинетической точки зрения организм необходимо представить в виде совокупности отсеков (камер или компарментов), а это, в свою очередь, требует соответствующих оговорок. Детально методы членения организма на камеры будут представлены в главе 7.

Первоначально было введено понятие «полнота всасывания», критерием для которого служил относительный уровень препарата в крови. В случае сравнения двух форм лекарственного средства учитывались их максимальные концентрации в крови. Однако такой подход к оценке всасывания препаратов неадекватен по ряду причин. Во-первых, потому, что выраженность биологического действия многих лекарств обусловлена не только их максимальным уровнем, но и временем, в течение которого концентрация превышает минимальный уровень, необходимый для реализации эффекта. Во-вторых, эмпирическая оценка момента максимума концентрации лекарства может оказаться неверной.

Эти обстоятельства побудили исследователей характеризовать процесс всасывания лекарственных средств не отдельными точками, а фармакокинетической кривой в целом.

В настоящее время оценивают количественно всасывание препарата по двум критериям: 1) скорость всасывания; 2) степень (количество от введенной дозы) всасывания.

Существующие методы оценки скорости всасывания лекарственных средств можно разделить на две группы. К первой из них относятся методы, основанные на допущении линейности кинетики всех процессов поступления, переноса и элиминации лекарства в организме. В большинстве случаев применение этих методов предполагает анализ кинетики всасывания в рамках математической модели определенной структуры, хотя в некоторых случаях структура модели не постулируется [75].

Ко второй группе можно отнести методы, основанные на допущении линейности лишь тех процессов, которые происходят с лекарственным средством после его поступления в системный кровоток, тогда на кинетику процесса всасывания аналогичные ограничения не накладываются. Это достигается путем предварительного воспроизведения кинетического профиля процесса всасывания лекарственного средства по данным его фармакокинетики в крови. Перед методами первой группы эти методы обладают важным преимуществом. Их применение позволяет проанализировать закономерности процесса всасывания в тех случаях, когда его кинетика описывается уравнением, порядок которого отличен от единицы [85].

Не вдаваясь в подробности анализа существующих методов, отметим их общие тенденции. Исходя из закона Фика скорость диффузии из кишечника (концентрация вещества C_2) в плазму крови (C_1) составляет

$$\frac{dc}{dt} = k(C_1 - C_2).$$

В случае $C_2 < C_1$ можно записать

$$\frac{dc}{dt} = kC,$$

откуда следует, что скорость всасывания имеет первый порядок (раздел 4.1).

Если всасывание лекарств осуществляется специфическими переносчиками или они подвергаются метаболической трансформации в кишечнике, то их скорость поступления в кровь описывается уравнением Михаэлиса—Ментен (раздел 4.2; уравнение 4.19). При низких концентрациях препарата в просвете кишечника величина k будет значительно больше C , в связи с чем скорость изменения концентрации снова будет иметь первый порядок. С другой стороны, при очень больших концентрациях из этого соотношения следует, что скорость транспорта препарата будет подчиняться кинетике нулевого порядка.

В целом скорость всасывания характеризует константа (k) этого процесса, имеющая размерность ч^{-1} . Однако следует отметить, что такая константа относится к реально существующим при условии вычленения камер одного объема, что редко можно встретить в организме. Поэтому с нашей точки зрения более подходящими в этом плане могут быть фазовые модели фармакокинетики [86].

Относительная степень всасывания, как уже отмечалось, определяется не отдельными точками, а фармакокинетической кривой в целом.

Интегральное представление о кривой проще всего получается путем измерения площади, ограниченной этой кривой и осью абсцисс и обозначается этим показателем AUC (area under the curve — площадь под кривой).

Следовательно, скорость всасывания — это скорость, с которой введенная доза лекарственного средства попадает в общий кровоток. Степень всасывания — это та часть (фракция) от введенной дозы, которая за определенное время попадает в кровоток. Различия между степенью и скоростью всасывания

представлены на рис. 6.15. Оба эти показателя играют существенную роль в проявлении фармакологического действия препаратов. Так у различных лекарственных форм (*А*, *Б* и *В*) наблюдается существенное отличие по выраженности клинического эффекта. Препарат *В* потребует введения двойной дозы для достижения концентрации в крови, эквивалентной содержанию формы *А*. В этом случае лекарство формы *А* достигает минимальной эффективной концентрации раньше, чем препарат *В* и сохраняется более продолжительное время. В режиме многократного введения лекарственные формы *А* и *В* дадут средний уровень концентраций в крови, несмотря на то, что форма *А* будет иметь несколько более высокие максимальные и низкие минимальные значения концентраций.

О механизме всасывания лекарств говорят, что он относится к кинетике всасывания нулевого порядка (раздел 4.1, уравнение 4.1), когда скорость не зависит от количества лекарства, которое остается в кишечнике, например, когда она определяется скоростью желудочной эвакуации, или когда вводятся лекар-

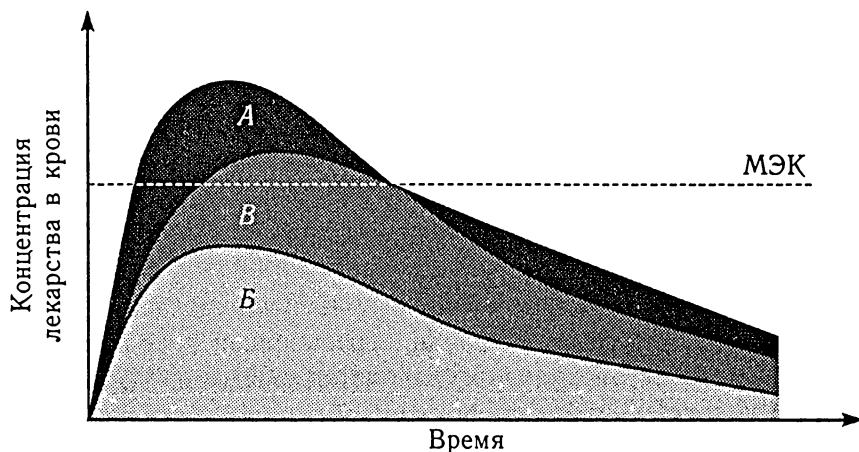


Рис. 6.15. Кривые концентрация-время, поясняющие, как изменения скорости всасывания и степени биодоступности могут влиять на длительность действия и эффективность одинаковой общей дозы лекарства, введенного в трех различных лекарственных формах. Пунктирная линия указывает на минимальную эффективную концентрацию (МЭК) лекарства в крови

ственные формы с контролируемым высвобождением. Напротив, когда вся доза растворяется в желудочном и кишечном соке, скорость абсорбции обычно пропорциональна концентрации и о ней говорят как о кинетике всасывания первого порядка (раздел 4.1, уравнение 4.3).

6.6.1. БИОДОСТУПНОСТЬ

Относительное количество лекарственного вещества, которое достигло системного кровотока и скорость, с которой этот процесс происходит называется биодоступностью. Такое определение отражает относительный характер понятия биологической доступности лекарства, а также интегральный (степень всасывания) и кинетический (скорость всасывания) в ее количественной оценке.

В зависимости от поставленной задачи исследования, биологическая доступность (F , выраженная в процентах) может быть *абсолютной* или *относительной*.

Абсолютная биодоступность — это та часть неизменного препарата, достигшая системного кровотока. Теоретически F может равняться нулю, для лекарства неспособного проникать через соответствующую мембрану или $F = 1$ для лекарства, которое полностью поступило в кровоток. Поэтому биодоступность лекарственного вещества после внутривенного введения составляет 1 или 100 %. На практике биодоступность определяют по формуле:

$$F = \frac{AUC_{ev}}{AUC_{iv}},$$

где AUC_{ev} и AUC_{iv} — соответствующие показатели площадей под кривой при внесосудистом и внутрисосудистом путях введения.

Размерность AUC — ммоль·ч·л⁻¹; ммоль·мин·л⁻¹; мкг·ч·л⁻¹; мкг·мин·л⁻¹ и др.

Математически AUC представляет собой интеграл $C(t)$ от нуля до бесконечности во времени:

$$AUC = \int_0^{\infty} C dt.$$

Эту величину в фармакокинетике называют также статическим моментом нулевого порядка.

Обозначение от нуля до бесконечности означает, что оценивается полная площадь под кривой. Однако, исходя из ситуации представленной на рис. 6.15 можно заключить, что лучше в эксперименте не сопоставлять общие площади под соответствующими кривыми фармакокинетики, а площади, ограниченные кривыми и уровнем минимальной эффективной концентрации (МЭК) препарата.

Существуют специальные модельные и немодельные методы расчета AUC [75, 85].

Величина AUC связана с другими фармакокинетическими параметрами. Во-первых, с $AUMC$ (area under the moment curve — площадь под кривой момента). Это суммарная площадь под кривой произведения времени на концентрацию лекарственного препарата в организме от момента его попадания туда до полного удаления из него. Во-вторых, с MRT (mean residence time — среднее время удерживания).

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC}.$$

В третьих, величина AUC обратно пропорциональна общему клиренсу (Глава 9) препарата. И, наконец, в случае линейного распределения препарата в организме (Глава 7) величина AUC пропорциональна общему количеству (дозе) препарата, поступившего в организм.

Для многих препаратов, вводимых внесосудистым путем, понятие степени всасывания в системный кровоток равнозначно понятию всасывания в месте введения.

Однако некоторые лекарственные вещества с высокой степенью всасывания регистрируются в системном кровотоке в небольших количествах и иногда их уровень в крови составляет 10—20 % введенной дозы. Это объясняется тем, что после всасывания в кишечнике лекарство доставляется с кровью по портальной венозной системе в печень до того как оно попадает в системную циркуляцию. Лекарство может метаболизироваться в кишечнике (ферментами стенки или микрофлорой), но чаще всего именно в печени происходят основные процессы метаболизма перед попаданием препарата в общий кровоток. Кроме того печень может секретировать лекарства в желчь. Любой из этих факторов носит свой вклад в данный тип снижения биодоступности. В литературе оно получило название *эффекта первичного прохождения* или *пресистемной элиминации*. Именно этой причиной объясняются различия в уровнях лекарственных средств при их введении в периферическую и воротную вены. Таким путем удалось объяснить относительно низкую биодоступность аспирина и пропанолаола при приеме внутрь.

Явление первичного прохождения через печень характерно для быстро метаболизирующих веществ. При этом скорость, с которой они попадают в печень, относится к важной детерминанте этого процесса. Многие препараты метаболизируются в печени полностью, но с меньшей скоростью, и поэтому их потеря при первом прохождении через печень незначительна. В связи с этим при парентеральном введении таких препаратов корректировать дозу с учетом пресистемной элиминации не требуется. Аналогично следует относиться и к препаратам, назначаемым внутрь, которые являются быстро метаболизирующими, но образующими фармакологически активные метаболиты.

Следовательно, для лекарственных средств, для которых характерен феномен первичного прохождения, понятия биодоступность и степень всасывания не идентичны. В остальном эти понятия существенно не отличаются.

6.6.2. БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТЬ

Появление на фармацевтическом рынке так называемых препаратов-генериков перевело понятие биодоступности лекарств из чисто исследовательской плоскости в практическую. Препарат-генерик это такое лекарственное средство, срок патентной защиты которого закончился и он перестал быть собственностью фармацевтической компании, которая его разрабатывала или владела первой лицензией на его реализацию. Количество таких препаратов стремительно выросло за последние годы. Так если в 1975 г. их было 9 % от общего мирового производства лекарств, то в 1991 г. — 40 %, а в 1995 г. — 65 % [87].

Требования к эффективности и безопасности генерических препаратов, которые производятся различными фирмами, сделали необходимыми разработать метод их оценки и выразить ее аналитически, т. е. в виде формулы. Длительные эксперименты, с использованием всевозможных фармакодинамических и фармакокинетических показателей, привели к возникновению понятия биологической эквивалентности (биоэквивалентности). Оно соответствует отношению площадей под кривыми, полученными при введении лекарственного средства в стандартной (*B*) и изучаемой (*A*) формах:

$$F = \frac{AUC_A}{AUC_B}.$$

Изучение биоэквивалентности относится к одному из видов клинической оценки лекарственных средств.

Исходя из неоднозначности трактования биоэквивалентности, обусловленного тем, что она может существовать и для различных форм одного и того же лекарственного средства и даже для совершенно различных препаратов (например, аспирин может быть биоэквивалентным парацетамолу) введены понятия фармацевтическая и терапевтическая эквивалентности.

Фармацевтически (химически) эквивалентными считаются два или более лекарственных средства, содержащих одну субстанцию в одинаковых концентрациях или дозах и вводимые одним путем. В этом случае не обязательна идентичность таких показателей как состав вспомогательных веществ, цвет, вкус и форма таблеток.

Согласно *FDA* (Food and Drug Administration) в США две формы одного и того же лекарственного средства могут быть *терапевтически эквивалентными* тогда, когда выполняются следующие требования: 1) они должны быть фармацевтически эквивалентны; 2) они должны быть биоэквивалентными; 3) они должны соответствовать фармакопейным стандартам (качество, чистота, идентичность и др.); 4) они должны иметь идентичные этикетки; 5) их производство должно осуществляться согласно требованиям *GMP*.

Следует также отметить, что во многих случаях в понятие биоэквивалентности одновременно заложены понятия фармацевтической и терапевтической эквивалентности.

Оценка достоверности биоэквивалентности проводится по параметрам AUC_t (площадь под частью кривой, от нуля до некоторого времени) или AUC_∞ (от нуля до бесконечности по времени), а также C_{\max} — максимальная концентрация. Для обычных лекарственных форм параметром являются C_{\max}/AUC_t или C_{\max}/AUC_∞ , а для форм с пролонгированным действием $(C_{\max} - C_{\min})/C_{ss}$ [88].

В этом случае C_{ss} — стационарная концентрация препарата в плазме крови (ммоль/л; мкг/мл), которая устанавливается при поступлении лекарства в организм с постоянной скоростью. В случае интермитирующего введения препарата через одинаковые промежутки времени в одинаковых дозах используют понятия максимальная (C_{\max}) и минимальная (C_{\min}) стационарная концентрации.

Препараты считаются биоэквивалентными, если 90 %-й доверительный интервал для геометрического среднего, численного для индивидуальных отношений логарифмически

преобразованных значений каждого из перечисленных фармакокинетических параметров, за исключением C_{\max} , для исследуемого препарата к таковым для препарата сравнения, находится в пределах 0,80—1,25. Для C_{\max} соответствующие пределы составляют 0,70—1,43. Границы вышеупомянутого доверительного интервала рассчитывают при помощи двух односторонних тестов после логарифмического преобразования значений фармакокинетических параметров.

Если вышеупомянутый доверительный интервал в случае параметров AUC_t или AUC_{∞} выходит за установленные пределы, препараты считаются небиоэквивалентными при условии, что мощность статистического критерия составляет не менее 80 %.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ

По приблизительным оценкам, наибольшее расстояние, на которое клетки в тканях отстоят от капилляров, составляет 0,125 мм. Так как клетки человека имеют средний диаметр 0,01 мм, молекула лекарства, проходя из места введения в кровоток, или наоборот, из кровотока в клетки со специфическим рецептором, должна преодолеть барьер, состоящий из 10—12 клеток. Такое расстояние незначительно, и процессы, обеспечивающие передвижение лекарственных средств в его рамках, относятся к микротранспорту. Перенос лекарств из участка всасывания к органу или ткани, содержащей клетки со специфическими биологическими мишенями действия лекарств относится к макротранспортным процессам и в рамках *ADME* носит название распределения (distribution).

С фармакокинетической точки зрения важность этого явления заключается в том, что в процессе фармакотерапии невозможно воздействовать на многие органы и ткани непосредственно, а воздействие достигается только за счет процесса распределения лекарства.

Для осуществления распределения препарата во внутренней среде организма необходимо наличие, по крайней мере, двух составляющих: магистральных путей передвижения и средств доставки.

Основным магистральным путем транспорта лекарств в организме являются его водные пространства: внутрисосудистое, интерстициальное (межклеточное) и внутриклеточное (рис. 7.1).

Обмен веществами между плазмой крови и интерстициальной жидкостью происходит через стенки капилляров, высокопроницаемых для воды и электролитов. Такой обмен происходит очень быстро, и поэтому состав интерстициальной жидкости,

Жировая ткань организма, которая составляет приблизительно 20 % массы тела, поглощает большое количество липидорастворимых соединений (барбитураты, бенздиазепины, стероиды, гормоны).

Избирательное накопление лекарственных средств в определенных тканях может происходить с участием специфических переносчиков.

Имеются единичные наблюдения, указывающие на поглощение в значительных количествах некоторых препаратов костной тканью. Это прежде всего относится к тетрациклину, хотя механизмы описанного [90] явления не установлены.

7.1. ОТСЕКИ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ СПЕЦИФИКУ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВА В ОРГАНИЗМЕ

Представленный выше краткий анализ избирательного поступления веществ в определенные органы и ткани требует объяснения причин, обуславливающих такие явления.

Как и в случае со всасыванием, процессу распределения характерны две составляющие части: 1) скорость распределения; 2) степень распределения. Первый показатель зависит от мембранной проницаемости (раздел 6.3) и скорости кровотока (перфузии) в органах. По этому показателю основные органы разделяются на две группы: 1) с высокой скоростью перфузии (мозг, сердце, почки, печень); 2) с низкой скоростью кровотока (кости, жировая ткань, мышцы, кожа).

Второй показатель (степень распределения) определяется липофильностью вещества (раздел 2.1.3), $pH-pK_a$ (раздел 2.1.2), связыванием с белками плазмы (раздел 6.3.3.5) и внутриклеточным взаимодействием.

Исходя из имеющихся данных [91], распределение лекарственных веществ в организме предполагает наличие в нем четырех отсеков (паттернов), обладающих относительно

формальными, но все еще физиологическими признаками (рис. 7.2).

К первому отсеку относится сосудистая система, в которой продолжительное время могут циркулировать такие вещества как декстран (плазмозаместители).

Вещества с низкой молекулярной массой, хорошо растворимые в воде (этанол, сульфонамиды) равномерно распределяются в тканевой жидкости, образуя второй отсек.

Третий отсек представлен тканями, в которых происходит накопление веществ, превышающее их плазматическую концентрацию в десятки раз. Для жирорастворимых веществ, своего рода депо является жировая ткань.

Особенностью четвертого отсека является неспецифическое распределение лекарственных средств, определяемое мембранной проницаемостью. Значительные количества в печени и почках связаны с их экскреторными функциями.

Возможность упрощенного представления организма системой отсеков (камер) физиологически обеспечивается особой

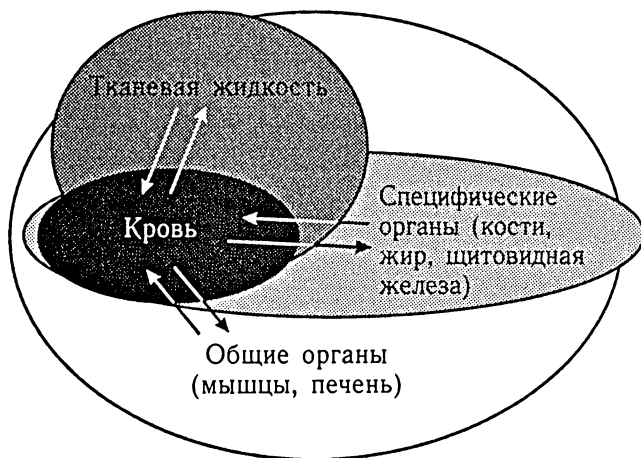


Рис. 7.2. Схематическое изображение четырех отсеков избирательного распределения лекарственных средств в организме

делается вывод о применимости модели с первоначально выбранной структурой или о необходимости ее усовершенствования. В последнем случае в модель могут быть введены дополнительные камеры или пути переноса препарата, которые соответствуют конкретным органам или процессам распределения по организму (раздел 10.3).

Приемы составления дифференциальных уравнений перфузионной модели в принципе аналогичны описанным для классических моделей. Однако в первом случае вместо не имеющих физического смысла констант эти уравнения содержат параметры скорости кровотока через орган, параметры распределения препарата между органами и кровью, константы Михаэлиса—Ментен в случае описания метаболизма препарата или параметры изотермы связывания в случае формализации его взаимодействия с белками крови.

Несмотря на очевидные достоинства перфузионных моделей, их использование сдерживается сложностью математического аппарата, а также необходимостью использования многочисленных физиологических характеристик. Поэтому в большинстве случаев для моделирования процессов распределения лекарственных средств во внутренней среде организма используют классические модели фармакокинетики. Выбор структуры и значения кинетических параметров таких моделей определяются исключительно путем формального анализа кинетики препаратов в тест-тканях. Придавая значение крови, как связующему звену между органами и тканями, фармакокинетическое описание может осуществляться на основании концентрации препарата в ее плазме.

Описание процессов распределения препаратов в рамках классических моделей фармакокинетики связано с понятием компартмент (камера). В частном случае камерой может быть и орган, но в основе понятия связи с органом членением организма нет. Понятие камеры выражается единицей формализованной фармакокинетической системы, в которой равномерно распределен препарат. Уже сам этот принцип невыполним

в конкретных условиях физиологии. Однако описание процесса распределения препарата посредством определенного математического закона можно провести лишь на основе подобного представления. Поэтому критерием правильности членения организма на некоторое число камер является не степень приближения к анатомо-физиологической структуре, а исключительно принцип математического правдоподобия. Отсюда следует, что в этой системе достаточно различить такое число камер, какое необходимо для интерпретации некоторых опытных данных. Очевидно, что минимальным вещественным целым является единица. Соответственно единица является минимальным количеством камер фармакокинетической модели. Увеличение числа камер до двух может быть произведено на основе физиологических соображений и лишь в том случае, когда математический анализ данных опыта покажет недостаточность подобного элементарного представления (раздел 10.3).

7.2. РОЛЬ ТКАНЕВЫХ БАРЬЕРОВ В РАСПРЕДЕЛЕНИИ ЛЕКАРСТВ В ОРГАНИЗМЕ

При исследовании кинетики распределения какого-либо препарата практически во всех случаях наблюдается его неравномерное содержание в определенных органах и тканях экспериментальных животных. На рисунке 7.4 представлены типичные кривые, характеризующие количественное содержание гидазепама и его деалкильного метаболита в органах и тканях мышей [92].

Для выполнения этих работ нами были синтезированы оба вещества, меченые радиоактивным изотопом [93]. Содержание радиоактивных продуктов определяли в гомогенатах (1:5) органов и тканей мышей после введения животным одной группы 1,4 мг/кг гидазепама, а другой 1,4 мг/кг деалкильного метаболита гидазепама.

Как видно из рис. 7.4, в организме мышей после введения им гизадепама отмечается значительное количество ^{14}C -продуктов в печени, почках и жировой ткани, и значительно меньше в других органах и тканях. Несколько близкая картина отмечена и для процесса распределения метаболита гизадепама в организме экспериментальных животных. Не вдаваясь в детальный анализ особенностей фармакокинетики обоих веществ, лишь отметим на этом примере неоднородность их распределения по

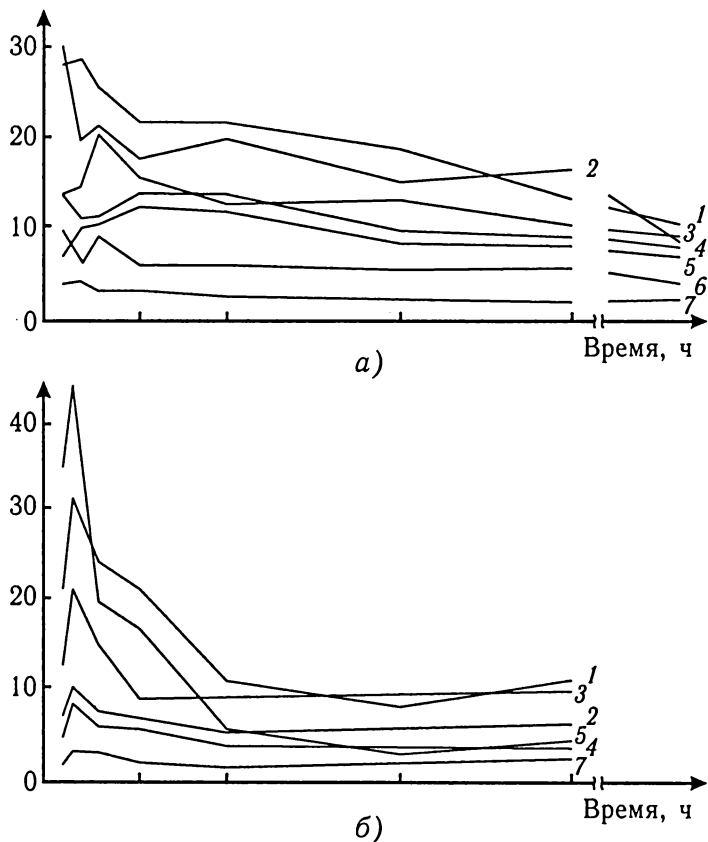


Рис. 7.4. Кинетика содержания радиоактивного материала в органах и тканях мышей при внутрибрюшинном введении ^{14}C -гизадепама (а) и ^{14}C -деалкильного метаболита гизадепама (б): 1 — печень; 2 — жировая ткань; 3 — почки; 4 — мышечная ткань; 5 — головной мозг; 6 — селезенка; 7 — плазма крови

органам и тканям. Анализ большого числа препаратов, для которых проводились аналогичные исследования, показывает идентичность этих процессов.

Следовательно, организм обладает определенными внутренними барьерами, регулирующими избирательность поступления тех или иных веществ в органы и ткани. История исследования этого вопроса начинается с конца 20—начала 30-х гг. XX века. На основании большого числа наблюдений было высказано предположение, что между кровью и тканевой жидкостью находятся дифференцированные защитно-регулирующие приспособления, называемые *гисто-гематическими барьерами* [94]. Функциональная характеристика отдельных барьеров определяется физиологическими и морфологическими особенностями соответствующих органов и тканей. Особенностью каждого гисто-гематического барьера является его избирательная проницаемость, т. е. способность пропускать одни вещества и задерживать другие.

Вообще не должно складываться впечатление, что в организме сформировались определенные гисто-гематические барьеры, препятствующие поступлению в органы и ткани чужеродных веществ, в том числе и лекарственных. Основная роль этих барьеров — регуляция поступления из крови в органы и ткани необходимых естественных энергетических ресурсов и своевременное удаление продуктов клеточного обмена, что способствует поддержанию гомеостаза. Одновременно они препятствуют поступлению из крови чужеродных соединений.

Практически к гисто-гематическим барьерам могут быть отнесены все без исключения барьеры, образованные между кровью и органами. К ним обычно относят наиболее изученные: гематоэнцефалический (кровь — ЦНС), гемато-офтальмический (кровь — водянистая влага глаза), гемато-лабиринтный (кровь — эндолимфа лабиринта).

Эти барьеры могут быть между кровью и жидкими средами организма (спинномозговой жидкостью, лимфой, плевральной жидкостью).

Структура гисто-гематических барьеров определяется в значительной мере строением органа. Она отличается некоторыми особенностями в различных органах и тканях и варьирует в зависимости от их морфологических и физиологических особенностей. Однако во всех случаях основным структурным элементом гисто-гематического барьера является кровеносный капилляр. В то же время по форме ядра, строению его оболочки, структуре и количеству хроматина эндотелиальные клетки разных органов значительно различаются между собой. Складывающиеся в процессе онтогенеза чрезвычайно изменчивые особенности эндотелиальных клеток являются морфологической основой избирательной проницаемости гисто-гематических барьеров.

Непосредственно под эндотелием располагается базальная мембрана капилляров, состоящая из большого количества нейтральных мукополисахаридов. Предполагается, что в барьерных механизмах принимают участие базальная мембрана, а также аморфное вещество и волокна.

• 7.2.1. БАРЬЕРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

К биологическим барьерам, регулирующим поступление в центральную нервную систему (ЦНС) эндогенных и экзогенных химических веществ относятся барьеры между кровью и головным мозгом (blood-brain barriers — BBB) и между кровью и спинномозговой жидкостью (blood-CSF barriers). Последние данные о структуре и локализации белков — переносчиков в нервной системе свидетельствуют о том, что к барьерным системам следует относить и глиальные клетки мозга.

Функции BBB (в русскоязычной литературе *гематоэнцефалический барьер* — ГЭБ) определяются морфологическими и физиологическими особенностями эндотелия сосудов мозга [95].

Капилляры в мозге отличаются от капилляров большинства других участков организма тем, что их эндотелиальные клетки имеют место соединения в виде плотных контактов (раздел 6.2). Действительно, тесно прилегающие друг к другу эндотелиальные клетки капилляров, соединенные с базальной мембраной, а также тонкий слой отростков — астроцитов, препятствуют контакту крови и мозговой ткани. Этот барьер препятствует, за незначительным исключением, парацеллюлярному транспорту лекарств из крови в мозг и спинномозговую жидкость (СМЖ). Такая изоляция мозга приводит к образованию ограниченного объема, в пределах которого осуществляются интегративные функции ЦНС [96].

Особенности строения мембран эндотелиальных клеток сосудов головного мозга, предотвращающих прохождение через мембрану гидрофильных соединений, предполагают наличие активных транспортных систем, обеспечивающих головной мозг необходимыми для функционирования ЦНС веществами. Значительное количество митохондрий в эндотелии головного мозга указывает на способность к поддержанию энергозависимых процессов, поддерживающих транспорт веществ через ГЭБ.

Аминокислоты транспортируются через ГЭБ специфически энергозависимыми системами. Большие нейтральные аминокислоты (тирозин, триптофан, фенилаланин) требуются для синтеза медиаторов и транспортируются системой *L* [97]. Транспорт малых нейтральных аминокислот, таких как аланин, глицин, пролин, ГАМК, в сторону ЦНС отсутствует, так как они синтезируются в мозге. Более того, транспортная система этих аминокислот, известная как система *A*, выкачивает избыточное количество малых нейтральных аминокислот и их метаболитов из СМЖ в кровь [98]. Таким образом, аминокислоты, необходимые для синтеза медиаторов, активно транспортируются в мозг, в то время как нейромедиаторы и их метаболиты «выкачиваются» из мозга. Этот механизм наряду с экстранейрональным захватом медиатора позволяет поддерживать их внеклеточное количество в ЦНС на постоянном уровне.

Одной из важнейших функций ГЭБ является транспорт глюкозы в мозг. Глюкоза доставляется к нейронам эндотелием посредством специфической системы Глут 1, которая осуществляет этот процесс за счет облегченной диффузии. Транспортная система глюкозы является саморегулирующейся, в областях с высоким метаболизмом активность данной системы выше [55].

Захват лактата, холина, аденозина и аденина осуществляется активно направленной в просвет капилляра поверхностью эндотелия с участием специфических переносчиков [99].

Транспорт крупных белковых молекул обеспечивается путем их активного захвата. Эндоцитоз и транцитоз эндотелиальными клетками сосудов головного мозга описан для молекул трансферрина, инсулиноподобного фактора роста, альбуминов, липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Транцитоз представляет собой высокоспецифический процесс, связанный со взаимодействием транспортируемых структур и высокоспецифичных рецепторов на поверхности клетки. Известно, что многие клетки вне ЦНС имеют трансферриновые рецепторы, однако процесс транцитоза описан только для эндотелиальных клеток головного мозга. Находясь в крови, трансферрин присоединяет железо, и в форме ферротрансферрина взаимодействует с высокоспецифическими трансферриновыми рецепторами на поверхности эндотелиальных клеток. Взаимодействие с рецепторами приводит к захвату (интернализации) молекулы белка с образованием в цитоплазме эндотелия пузырьков (эндосом) диаметром 40—70 нм. Затем посредством экзоцитоза содержимое пузырьков попадает в мозг [100].

Аналогично происходит взаимодействие ЛПНП с соответствующими рецепторами эндотелия капилляров головного мозга. Аполипопротеин В, находящийся на поверхности ЛПНП, выполняет роль вектора, обеспечивающего взаимодействие с соответствующим рецептором.

Эндотелиальные клетки ГЭБ экспрессируют также значительное количество ферментных систем, метаболизирующих лекарственные средства: пептидазы, щелочную фосфатазу,

СУР450 (2E1, 2B1, 2B2), УДФ — глюкозилтрансферазу и глутатионтрансферазу.

Барьер между кровью и СМЖ выполняет значительную прижизненную функцию, направленную на избирательное поступление нутриентов и ксенобиотиков через мембраны сосудистого сплетения. Сосудистые сплетения совместно с плотными соединениями (эпендимные клетки) и составляют основу *гематоликворного барьера*. Следовательно, растворенное вещество, прежде чем проникнуть через капиллярные стенки и достичь спинномозговой жидкости, должно преодолеть барьерные системы эпендимных клеток.

Подобно ГЭБ, гематоликворный барьер содержит различные рецепторы, ферменты, ионные каналы и транспортные системы, регулирующие процесс секреции и реабсорбции [101]. В апикальной части эпителиальных клеток сосудистого сплетения экспрессируются Na^+/K^+ -АТФаза, ионные каналы для Cl^- , K^+ и $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ котранспортных переносчиков. Базолатеральная часть клеток содержит Na^+/H^+ , $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ антипортные системы (раздел 6.3.2.2.), облегчающие транспорт неэлектролитов (рис. 7.5).

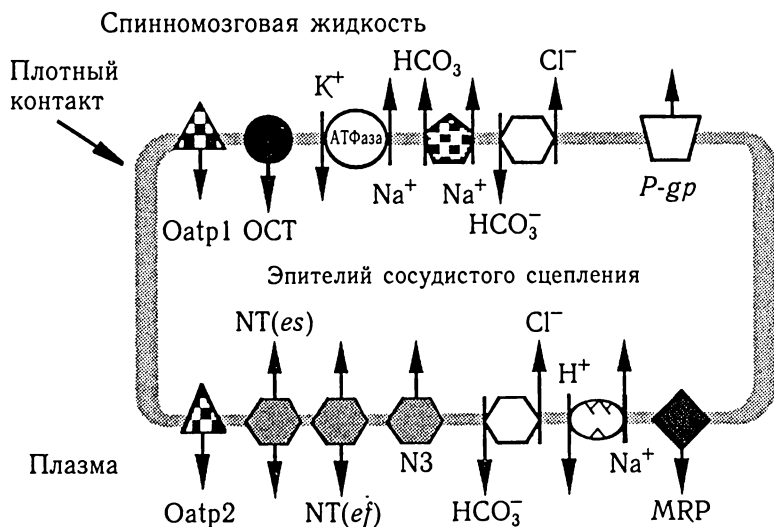


Рис. 7.5. Транспортные системы гематоликворного барьера

Среди ферментов клеток гематоликворного барьера, с довольно высоким уровнем активности, необходимо отметить СУР2В1, СУР2В2, УДФ-глюкуронозилтрансферазу и глутатионпероксидазу [55]. Наличие в глиальных пластинках переносчиков органических соединений позволило отнести их также к барьерным системам ЦНС [102, 103]. Глиальные клетки выполняют в нервной ткани следующие функции: они играют опорную роль, участвуют в переносе веществ из крови в нервные клетки и обратно, образуют миелиновые оболочки и защищают нейроны от проникновения чужеродных веществ. Отдельные указания на секреторную функцию клеток глии, например питуицитов (особого рода астроцитов) в нейрогипофизе, остаются еще спорными. Между нейронами и глиальными клетками существуют не только морфологические, но и четкие биохимические различия. Например, митохондрии в клетках глии содержат больше моноаминоксидазы, локализованной в наружной митохондриальной мембране, и больше аденозинтрифосфатазы, чем в нейронах. Митохондриальные ферменты глии имеют прямое отношение к синтезу белков [104].

Различают две группы глиальных клеток: 1) клетки макроглии (протоплазматические и фибриллярные астроциты, олигодендроциты); 2) клетки микроглии. Протоплазматические астроциты обладают многочисленными отростками, расходящимися во все стороны от перикариона; эти отростки сравнительно коротки. У фибриллярных астроцитов отростков меньше, но они длиннее и тоньше и содержат пучки филаментов. Такие отростки, богатые филаментами, в классической гистологии называют также глиальными волокнами. Протоплазматические астроциты встречаются главным образом в сером веществе ЦНС, а фибриллярные — преимущественно в белом веществе; эти две группы связаны переходными формами. Отростки астроцитов заполняют пространство между телами и отростками нервных клеток и образуют густую сеть, в которой лежат нейроны. Особые отростки астроцитов подходят к капиллярам и образуют вокруг них «манжеты». Совокупность

астроцитарных ножек, окружающих кровеносный сосуд, называют *membrana limitans gliae prevascularis*. Отростки клеток образуют также пограничный слой на поверхности центральной нервной системы (*membrana limitans piaе*), который вплотную прилегает к базальной мембране [105].

Астроциты выполняют значительную физиологическую роль, способствуя поддержанию гомеостаза ЦНС. Эти клетки образуют друг с другом электрические связи посредством плотных контактов. Когда несколько клеток деполяризуются вследствие местного повышения концентрации K^+ , между деполяризованными и недеполяризованными клетками возникает ток. Этот электрический ток создает вход K^+ в деполяризованные астроциты, внеклеточную концентрацию калия. Благодаря высокой K^+ проницаемости и электрическим связям между астроцитами они действуют как буфер в случае повышения внеклеточной концентрации K^+ .

В отличие от нервных клеток, глиальные клетки невозбудимы; во время деполяризации Na^+ проводимость их мембраны не повышается. Проводимость их мембран не меняется и в присутствии синаптических нейромедиаторов.

Исследования, проведенные на культуре и изолированных астроцитах, показали наличие в мембране этих клеток рецепторов различных нейромедиаторов (глутаминовых, глициновых, тауриновых, ГАМК и других моноаминов). Определенное расположение этих рецепторов способствует обмену сигналами между астроцитами и нейронами.

Отметим также, что астроциты принимают участие в воспалительных процессах и иммунном ответе [55].

Клетки олигодендроглии (олигодендроциты) часто имеют округлую форму. Они мельче астроцитов, и от их тел отходит меньшее число отростков. Сферические ядра олигодендроцитов заметно меньше и богаче гетерохроматином, чем ядра астроцитов. Их цитоплазма плотнее и содержит больше органоидов, среди которых выделяются цистерны гранулярной эндоплазматической сети, окружающие ядро, и рибосомы; филаменты

отсутствуют. У молодых животных описаны переходные формы между астроцитами и олигодендроцитами. Олигодендроциты имеются и в сером, и в белом веществе мозга. В сером веществе они нередко тесно прилегают к телам нейронов, а в белом веществе часто бывают расположены рядами или группами.

В литературе приводятся многочисленные данные [55, 107] о транспорте ионов, нейромедиаторов, нутриентов через мембраны олигодендроцитов и нейронов, однако они незначительны по отношению к лекарственным средствам [108].

Функция микроглии заключается в поглощении остатков погибших нервных клеток и посторонних частиц и в запасании жира. Для ее клеток характерны темное удлиненное ядро и относительно большой объем цитоплазмы. В этих клетках экспрессируются различные ионные каналы [109] и некоторые рецепторы нейромедиаторов: GluR5-7; NR2A/B; mGlu5a; Glu5-b [55].

Структурные особенности барьерных систем ЦНС в полной мере не отражают все защитные возможности организма. Так, в течение ряда лет не было объяснено явление низкой проницаемости в мозг некоторых липофильных соединений (винкристин, адриамицин, блеомицин, лоперамид). Вначале считалось, что их высокая молекулярная масса является основной причиной низкого поступления веществ в мозг. Однако дальнейшие исследования показали, что низкая концентрация этих соединений в мозге обусловлена наличием белка-переносчика *P-gp*, выводящего вещества из эндотелия сосудов головного мозга. Таким образом, активными участниками в барьерных механизмах являются и переносчики лекарственных средств.

Благодаря столь сложной организации барьерных систем ЦНС не всегда удается найти взаимосвязь между физико-химическими свойствами веществ и проницаемостью этих структур. Так, для многих лекарств эта закономерность описывается уравнениями, где в качестве свойств веществ используются их липофильность, молекулярная масса и степень ионизации. Действительно, лекарственные средства с незначительной молекулярной массой, неионизированные и липофильные, в достаточных

количествах поступают в ЦНС. Напротив, большая масса, водорастворимость и ионизация составляют трудности для проникновения через ГЭБ [108]. Многие вещества не вписываются в определенную закономерность, что связано с участием в их транспорте переносчиков. Подобно другим органам и тканям (раздел 6.3.3) система, образующая барьерную структуру ЦНС, содержит (рис. 7.5) представителей всех классов белков-переносчиков (ОСТ, ОАТ, NT, *P-gp*, *MRP*).

Транспортные системы органических катионов ОСТ1 и ОСТ2 экспрессируются клетками ГЭБ и обладают значительным сродством к нейротоксинам и нейромедиаторам, производным моноаминов [56]. Более того, ОСТ2 являются составной частью нейронов человека, выполняющей функцию переносчиков дофамина, норэпинефрина, серотонина, гистамина и таких препаратов, как амантадин и мамантин, используемых при лечении болезни Паркинсона. Еще в большем количестве в головном мозге представлен ОСТ3, который обнаружен в гиппокампе, мозжечке и коре головного мозга [55, 57].

Имеются сведения [110] и о наличии в клетках головного мозга ОСТN2, транспортирующего карнитин, тетраэтиламмоний и метил-4-фенилпиридин. Однако, распределение этого переносчика в определенных регионах мозга не установлено.

Клетки гематоликворного барьера в зависимости от природы лиганда (холин, N-метилникотинамид, тетраэтиламмоний, цитидин, серотонин, норэпинефрин) транспортируют их в разных направлениях [58]. В то же время остается невыясненным какой из представителей ОСТ осуществляет этот процесс.

Барьерные функции клеток ЦНС осуществляются также с помощью транспортных систем органических анионов. В клетках ГЭБ и сосудистых сплетениях больше всего локализовано ОАТ3 и в меньшей степени *Oatp1*, *Oatp2*, ОАТ1[59]. Далеко не все еще ясно относительно физиологической роли отдельных представителей ОАТ в ЦНС. Предполагается, что эта группа переносчиков, подобно почечным, выводит из спинномозговой

жидкости и головного мозга органические анионы (5-оксииндолуксусную кислоту, 2,4-дихлорфенолуксусную кислоту, салицилаты, метотрексат, бензилпенициллин).

В связи с дефицитом процесса синтеза *de novo* пиримидиновых трипептидов в мозге все обычные пурины и пиримидины и соответствующие нуклеозиды могут проходить через ГЭБ. Ранние исследования свидетельствовали о том, что пуриновые нуклеозиды транспортируются из крови в головной мозг посредством облегченной диффузии, в то время как для пиримидиновых аналогов имеется иной механизм [106]. Дальнейшее изучение этих закономерностей показало [102], что в эндотелиальных клетках и изолированных капиллярах экспрессируются *cit/N2*, *es* и *ei* NT, транспортирующие пуриновые нуклеозиды в головной мозг. В то же время было установлено, что пиримидиновые основания и нуклеозиды проникают через сосудистое сплетение, имеющее в своем расположении *es*, *ei* и *cibN3*.

В последнее время накапливается все больше сведений о наличии NT в глиальных клетках. В культуре астроцитов человека обнаружен [111] концентрационно-зависимый захват аденозина. Этот процесс может быть подавлен NT-ингибиторами (дипиридамом, нитробензилмератопуририбозид) и имеет двухфазный характер. Недавно был идентифицирован [112] транспортер (*rENT2*), нечувствительный к рибозиду нитробензилмеркаптопурина и локализирующийся в C_6 глиальных клетках крыс.

Большинство лекарственных средств, аналогов природных нуклеозидов (ставудин, зидовудин, диданозин) относятся к лигандам NT системы глиальных клеток.

Особая роль в составе компонентов клеток, образующих барьерную систему ЦНС, принадлежит *P-gp*, «выкачивающим» липофильные вещества из мозга в просвет сосудов. Среди изоформ *P-gp* основным местом экспрессии *mdr1a* является эндотелий сосудов головного мозга, в то время как для *mdr1b* глиальные клетки. Используя клетки (линия MZS-9) микроглии было показано [103] наличие *P-gp* в этих структурах. Накопление

такого лиганда *P-gp*, как дигоксин клетками микроглии, подавляется ингибиторами *mdr1/2* (верепамил, циклоспорин А) и ингибиторами протеаз (ритонавир, индинавир). В то же время, процесс накопления дигоксина микроглией нечувствителен к таким ингибиторам как индометацин и пробенцид.

Локализация и функциональные свойства MRP в ЦНС изучены в недостаточной степени. Высокий уровень MRP1 был зарегистрирован в сосудистых сплетениях с использованием метода полимеразной цепной реакции [113]. Эндотелиальные клетки мозга крыс, мышей и человека экспрессируют MRP1 и MRP5. Некоторые исследователи считают [114], что MRP представлен в ЦНС более широко (MRP 4—6).

Клетки микроглии мышей линии MLC-9 способны транспортировать винкристин. Этот процесс может быть энерго- и глутамат-зависимым. Подобно *P-gp*, MRP-транспортные системы подвергаются ингибированию сульфинпиразоном и индановиром (ингибитор протеаз).

Плотные межклеточные контакты клеток также участвуют в формировании ГЭБ. Как и в других случаях (раздел 6.2) межклеточные контакты ГЭБ относятся к адгезивным (промежуточный контакт, десмосомы, полудесмосомы), коммутационным или проводящим (щелевые контакты, синапсы) и замыкающим.

Между эпителиальными и эндотелиальными плотными соединениями, с одной стороны, и между плотными соединениями эндотелия периферических капилляров и капилляров ГЭБ — с другой имеются некоторые отличия. При электронной микроскопии ультратонких срезов плотных соединений в эпителиальных клетках фрагментные структуры оказываются связанными преимущественно с внешней стороной цитоплазматического (внутреннего) листка клеточной мембраны (*P-поверхность*).

Здесь они образуют некое подобие «сети», которая оставляет комплементарные углубления на внутренней стороне экстрацитоплазматического (внешнего) листка клеточной поверхности (*E-поверхность*). Эта поверхность в отличие от *P-поверхности* содержит гораздо меньшее количество таких фрагментов.

Несколько иной тип плотных соединений представлен в эндотелиальных клетках периферической кровеносной системы. В них сеть плотных соединений выражена слабо и имеется лишь незначительное количество разветвленных участков, а фрагменты структур контактов связаны преимущественно с *E*-поверхностью. На *P*-поверхности плотные соединения могут проявляться в виде небольших цилиндрических профилей [116].

Плотные контакты ГЭБ в образцах капилляров мозга млекопитающих характеризуются самой высокой степенью сложности по сравнению с образцами из внемозговых сосудов. Для этих систем характерна четкая взаимосвязь фрагментов структур плотных контактов с *P*-поверхностью цитоплазматических мембран эндотелиальных клеток мозговых капилляров.

Предполагается, что нормальная сборка плотных соединений осуществляется специфическими белками. Межклеточная адгезия опосредуется мембранными белками, принадлежащими к классу кадгеринов (раздел 6.2). N-кадгерины («нейтральные») впервые были обнаружены в нейронах и глиальных клетках нервной ткани. Считается [116], что клетки нервной ткани экспрессируют не менее 20 кадгеринов, используемых во время роста и дифференцировки при межклеточных взаимодействиях. Возможно, что в состав эндотелиальных клеток капилляров нервной ткани могут входить и N-кадгерины.

С цитоскелетом цитоплазматическая часть кадгерина связана посредством внутриклеточных белков из группы катенинов.

Белки коммуникационных контактов в эпителиальных клетках достаточно четко отделены от адгезивных соединений. Однако в эндотелиоцитах мозговых капилляров также различия менее выражены, особенно в области парацеллюлярных щелей. Первым белком плотных контактов оказался белок ZO-1, который обнаруживается одновременно в эпителиальных и эндотелиальных клетках. В мозговых и аортальных эндотелиальных клетках выявлены две изоформы ZO-1 (a^+ и a^-), из которых a^+ присутствует на *P*-поверхности плотных контактов. Другие белки плотных контактов ZO-2 и ZO-3, являющиеся также членами более

широкого семейства гомологов мембранных регуляторных ферментов из группы гуанилаткиназ (MAGUK) ограничены исключительно областью плотных соединений. Все они непосредственно связываются с окклюдинам. Кроме этих белков в периферической зоне плотных контактов определено еще два белка — цингулин (108—140 кД) и белок 7Н6 (155—175 кД). Оба они принимают участие в стабилизации белков ZO-1—3 (рис. 7.6).

По степени удаленности от клеточной мембраны периферийные белки плотных контактов могут быть разделены на две группы. Первая из них включает белки ZO-1—3, которые расположены в непосредственной близости от клеточной мембраны. Ко второй относятся цингулин и белок 7Н6, которые удалены от клеточной мембраны на расстояние не менее 40 нм.

В целом, селективность гематоэнцефалического барьера при переходе лекарств из крови в спинномозговую жидкость и центральную нервную систему значительно более выражена, чем при переходе из спинномозговой жидкости в кровь. Гематоэнцефалический барьер в данном случае подобен селективному фильтру в направлении кровь — центральная нервная система или предохранительному клапану в обратном направлении.

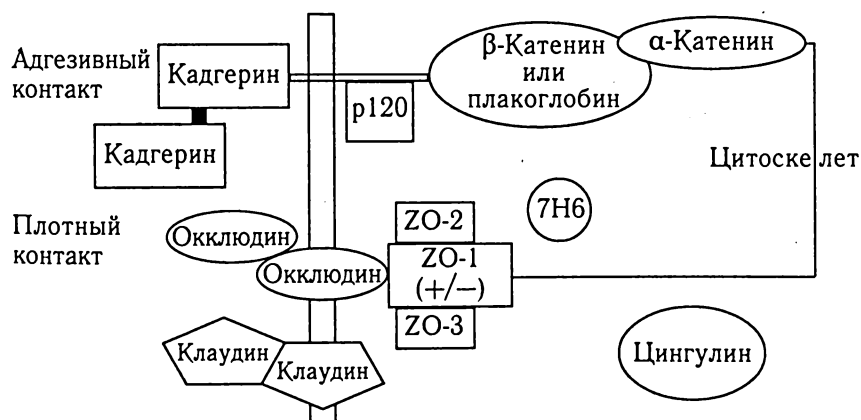


Рис. 7.6. Молекулярная структура адгезивных и плотных контактов

Пройдя через гематоэнцефалический барьер, лекарственное вещество должно еще проникнуть через мембраны в самом мозгу. Известно, что различные препараты накапливаются в разных частях мозга, однако до сих пор неизвестно, какие именно мембраны и их компоненты ответственны за такого рода избирательность. Так, в гипоталамусе происходит накопление в больших количествах аминов, электролитов и ряда лекарственных веществ, по сравнению с другими отделами головного мозга.

Установлено, что в мозге имеются безбарьерные зоны (нейрогипофиз, ножка гипофиза, эпифиз, серый бугор), куда после внутривенного введения вещества поступают беспрепятственно [95].

Следовательно, барьерные системы ЦНС представлены специальными структурами, включающими эндотелиальные клетки сосудов головного мозга (ГЭБ), эпителиальные клетки сосудистых сплетений (гематоликворный барьер) и глиальные клетки (астроциты, микроглия). Каждый из перечисленных компонентов содержит специфические ферменты, рецепторные и транспортные белки, а также секреторные системы, обеспечивающие их взаимодействие между собой и с окружающей средой. Наличие транспортной сети способствует регуляции поступления внутрь клеток и выведения из них лекарственных средств, что является критическим во всех звеньях системы ADME, а отсюда и фармакодинамического профиля.

Знание барьерных механизмов дает возможность экспериментатору оптимизировать направленный транспорт лекарств в ЦНС. Так, например, использование ингибиторов *P-gp* позволяет увеличить доставку в мозг препаратов, являющихся лигандами этого переносчика. Об этом свидетельствуют данные [115], в которых показано, что одновременное введение колхицина и винкристина значительно увеличивает концентрацию первого в мозге.

Наличие в ЦНС специфических транспортных средств, необходимых для доставки туда нутриентов позволило использовать

их для транспорта лекарственных средств. Благодаря близости по химическому строению с аминокислотами таких лекарств как α -метилдофа баклофен, габапентин, последние используют транспортную *L*-систему доставки нейтральных аминокислот [116]. Особенности строения *L*-системы были использованы для усиления транспорта аналога мелфалана, в структуру которого был введен радикал нафтоевой кислоты. В результате сродство такой молекулы к *L*-системе возросло в сто раз, а алкилирующая способность в полтора раза. К сожалению, такая транспортная система очень быстро насыщалась, так как нейтральные аминокислоты имеют к ней высокое сродство.

Система Глут 1 также интенсивно используется для направления транспорта монокарбоновых кислот, аминов и некоторых коротких пептидов [96].

Разработано несколько экспериментальных моделей доставки лекарственных средств в мозг посредством механизмов эндоцитоза. Представляют интерес исследования транспорта в мозг эндорфина, имеющего в качестве вектора производные альбумина и трансферина.

В последнее время в качестве транспортной системы интенсивно исследуются липосомы. Способность липосом обеспечивать или усиливать центральные эффекты известна давно, и она касается фармакодинамики фенитоина, лидокаина, кальцитонина, пропанидида, вальпроевой кислоты [96].

Одной из альтернатив липосомам, используемой в транспорте лекарств, могут быть наночастицы. Так, покрытые полисорбатом-80 наночастицы способны доставлять в мозг короткие пептиды (даларгин), гидрофильные вещества (тубокурарин), а также лоперамид и доксорубин, которые «выкачиваются» из мозга *P-gp*.

К патологическим факторам, изменяющим проницаемость ГЭБ, относится воспаление. Это определяется синтезом или выделением медиаторов воспаления, которые вызывают изменения микроциркуляции в мозге. Так, гистамин, взаимодействуя

с H_2 -рецепторами, увеличивает проницаемость барьера для низкомолекулярных веществ. Механизм увеличения порозности (образование пор) связан с нарушением плотных контактов между эпителиальными клетками [116]. Брадикинин ослабляет плотные соединения за счет возбуждения B_2 -брадикининовых рецепторов, увеличивая проницаемость для низкомолекулярных веществ.

Снижение барьерных функций ЦНС за счет изменения структуры плотных контактов также используется для доставки препаратов в мозг. Известно, что гипертонические растворы маннитола, мочевины или арабинозы при введении в кровяное русло способны увеличивать проницаемость ГЭБ за счет изменения объема и формы эндотелиальных клеток капилляров мозга. Такая осмотическая регуляция проницаемости плотных контактов позволяет обеспечить у пациентов с первичной лимфомой мозга и глиобластомой увеличение поступления в мозг в течение определенного времени ряда цитостатиков (циклофосфамида, прокарбазина, метотрексата).

Принципиально иной возможностью доставки препаратов в мозг является использование пролекарств. Примером эффективности данного подхода может служить способность транспортных систем доставлять в головной мозг лейэнкефалин, модифицированный липофильным заместителем. После прохождения пролекарства через ГЭБ липофильный компонент отщепляется.

7.2.2. ГЕМАТО-ОФТАЛЬМИЧЕСКИЙ БАРЬЕР

Эта система представлена, в основном, эндотелиальными клетками капилляров глаза, осуществляющими обмен между кровью и внутриглазными жидкостями. Функция эпителия в этом случае не ограничивается только его физико-химическими свойствами и не является пассивной. Эндотелий капилляров обладает рядом активных свойств благодаря наличию сложных

механизмов и систем (гиалуроновая кислота—гиалуронидаза), находящихся под влиянием нейрогуморальных факторов. Различные вещества проникают в стекловидное тело более медленно, чем в камерную влагу. Это свидетельствует о том, что капилляры сетчатки обладают более выраженной барьерной функцией, чем капилляры сосудистой оболочки. Заметное влияние на функцию гемато-офтальмического барьера оказывает тройничный нерв, а также симпатическая нервная система.

Жидкость передней камеры глаза значительно отличается по составу от плазмы крови. Поэтому поступление в камерную влагу и в стекловидное тело неэлектролитов совершается в весьма сложных условиях. Установлено [117], что скорость проникновения того или иного электролита в переднюю камеру не может обуславливаться его молекулярной массой. Также не может быть объяснена простой фильтрацией или диализом разница концентраций электролитов в камерной влаге и в крови. В настоящее время нет и единого воззрения на тот факт, почему одни лекарственные вещества, введенные в кровеносное русло, обнаруживаются в жидкости передней камеры, а другие, близкие по структуре и физико-химическим свойствам, нет. По-видимому, существуют значительные отличительные черты гемато-офтальмического барьера от других гисто-гематических барьеров.

В последнее время все же сделана попытка найти взаимосвязь между физико-химическими свойствами лекарственных средств и их способностью проникать через гемато-офтальмический барьер [118]. Найдена довольно высокая корреляционная зависимость между $\Delta \log P$ стероидов и β -блокаторов и их скоростью поступления в роговую оболочку глаза. Параболическая зависимость отмечается в случае использования коэффициента распределения препаратов в системе октанол—вода в качестве показателя.

Роговая оболочка глаза содержит СУР1В1, катализирующий метаболизм арахидовой кислоты. Образующийся при этом метаболит ингибирует $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{АТФазу}$, регулирующую секрецию внутриглазной жидкости [119]. Предполагается,

что определенные мутации в гене этого гемопротейна приводят к возникновению первичной глаукомы, проявляющейся в раннем детском возрасте (раздел 10.1.2).

7.2.3. ПЛАЦЕНТАРНЫЙ БАРЬЕР

Транспорт лекарственных средств через плаценту — сложная и малоисследованная проблема. Плацентарный барьер в функциональном отношении сходен с гематоликворным. Однако избирательная способность гематоликворного барьера осуществляется в направлении кровь—спинномозговая жидкость, а плацентарный барьер регулирует переход веществ из крови матери к плоду и в обратном направлении. Плацентарный барьер существенно отличается от других гисто-гематических барьеров тем, что участвует в обмене веществами двух организмов, обладающих значительной самостоятельностью. Поэтому плацентарный барьер не относится к типичным гисто-гематическим барьерам, однако осуществляет важную роль в защите развивающегося плода.

Морфологическими структурами плацентарного барьера являются эпителиальный покров хорионических ворсин и эндотелий капилляров, располагающихся в них. Синцитиотрофобласт и цитотрофобласт обладают высокой активностью в отношении всасывания и ферментативной активности. Такие свойства указанных слоев плаценты в значительной мере определяют возможность проникновения веществ. Существенную роль в этом процессе играет активность ядер, митохондрий, эндоплазматической сети и других ультраструктур клеток плаценты. Защитная функция плаценты ограничена определенными пределами. Так, переход от матери к плоду белков, жиров, углеводов, витаминов, электролитов, постоянно содержащихся в крови матери, регулируется механизмами, возникшими в плаценте в процессе фило- и онтогенеза.

Исследования трансплацентарного транспорта лекарств проводилось, главным образом, на средствах, применяемых в акушерстве. Имеются полученные в экспериментах с химическими веществами доказательства, иллюстрирующие быстрый переход от матери к плоду этилового спирта, хлоралгидрата, газообразных анестетиков общего действия, барбитуратов, сульфамидов и антибиотиков. Есть также косвенные доказательства поступления через плаценту морфина, героина и других наркотиков, так как у новорожденных детей от матерей-наркоманок обнаруживаются симптомы абстиненции [74].

Более 10 000 детей с деформациями конечностей (фокомелия) и другими патологическими признаками, рожденных женщинами, принимавшими талидомид во время беременности, являются еще одним печальным доказательством трансплацентарного переноса лекарств.

Перенос лекарственных веществ через плацентарный барьер происходит по всем рассмотренным выше механизмам, из которых наибольшее значение имеет пассивная диффузия. Недиссоциированные и неионизированные вещества переходят через плаценту быстро, а ионизированные — с трудом. Облегченная диффузия в принципе возможна, но для конкретных препаратов она не была доказана.

Скорость переноса также зависит от размера молекул, так как плацента непроницаема для веществ с молекулярной массой более 1000. Это объясняется тем, что диаметр поры в плаценте не превышает 10 нм и потому через них проникают только низкомолекулярные вещества. Такая преграда особенно важна при недлительном использовании некоторых веществ, например, блокаторов нервно-мышечных синапсов. Однако при длительном использовании многие препараты могут постепенно проникать в организм плода.

Наконец, посредством пиноцитоза могут проникать белки типа гамма-глобулина.

Червертичные аммониевые основания, а также миорелаксанты (декаметонит, сукцинилхолин) проникают через плаценту

с трудом, вследствие высокой степени их ионизации и низкой растворимости в липидах.

Из организма плода препараты выводятся посредством обратной диффузии через плаценту и почечной экскреции в амниотическую жидкость. Поэтому содержание чужеродного вещества в организме плода мало отличается от материнского. Учитывая тот факт, что в организме плода связывание препаратов с белками крови ограничено, их концентрация на 10—30 % ниже, чем в крови матери. Однако липофильные соединения (тиопентал) накапливаются в печени и жировой ткани плода [75].

В отличие от других барьерных функций, проницаемость плаценты широко варьирует в процессе беременности, что связано с возрастающими потребностями плода. Существуют данные об увеличении проницаемости к концу беременности. Это связано с изменениями в структуре пограничных мембран, в том числе с исчезновением цитотрофобласта и постепенным истончением синтицитотрофобласта ворсин плаценты. Проницаемость плаценты во второй половине беременности увеличивается не ко всем веществам, вводимым в организм матери. Так, проницаемость бромида натрия, тироксина и оксациллина выше не в конце, а в начале беременности. По-видимому, равномерное или ограниченное поступление к плоду ряда химических веществ зависит не только от проницаемости плацентарного барьера, но также от степени развития важнейших систем плода, регулирующих его потребности и процессы гомеостаза.

Зрелая плацента содержит набор ферментов, катализирующих метаболизм лекарственных средств (CYP) и транспортные белки (OCTN1/2, OCN3, OAT4, ENT1/2, *P-gp*). Ферменты могут продуцироваться в процессе беременности, поэтому следует принимать во внимание метаболические процессы, происходящие в плаценте, а также длительность использования препаратов при решении вопроса о возможности воздействия на плод циркулирующего в крови беременной вещества.

Обсуждая роль гисто-гематических барьеров в избирательном распределении лекарственных средств в организме, необходимо отметить, по крайней мере, еще три фактора, влияющих на этот процесс. Во-первых, оно зависит от того, находится ли лекарство в крови в свободной или связанной с белками форме. Для большинства гисто-гематических барьеров связываемая форма вещества является препятствием для их поступления в соответствующий орган или ткань. Так, содержание сульфонамидов в спинномозговой жидкости коррелирует только с той частью, которая находится в крови в свободном состоянии. Аналогичная картина отмечена для тиопентала при изучении его транспорта через гемато-офтальмический барьер [120].

Во-вторых, некоторые содержащиеся в крови и тканях или введенные извне биологически активные вещества (гистамин, кинины, ацетилхолин, гиалуронидаза) в физиологических концентрациях снижают защитные функции гисто-гематических барьеров. Противоположное действие оказывают катехоламины, соли кальция, витамин *P*.

В-третьих, при патологических состояниях организма гисто-гематические барьеры нередко перестраиваются, с увеличением или уменьшением их проницаемости. Воспалительный процесс в оболочках глаза приводит к резкому ослаблению гемато-офтальмического барьера. При изучении поступления пенициллина в спинномозговую жидкость кроликов в контроле и опыте (экспериментальный менингит) его содержание было в 10—20 раз больше в последнем случае [121].

Следовательно, трудно представить себе, что даже близкие по структуре вещества по профилю распределения будут вести себя аналогичным образом. Это объясняется тем, что данный процесс зависит от многочисленных факторов: химической структуры и физико-химических свойств препаратов, их взаимодействия с белками плазмы, метаболизма, тропности к определенным тканям, состояния гисто-гематических барьеров.

7.2.4. СУБКЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВ

Ранее (раздел 6.1) указывалось, что благодаря разветвленной системе мембран для клетки также характерно явление компартментализации, обеспечивающее интеграцию клеточных функций и соответствующий контроль. Следовательно, внутриклеточные мембраны также можно отнести к барьерным системам, регулирующим процесс распределения лекарств.

Исследования в этой области весьма ограничены, и в основном они посвящены взаимодействию препаратов с мембранными структурами клетки или с определенными ее органеллами в опытах *in vitro*. В некоторых случаях определялось субклеточное распределение лекарств, после его введения экспериментальным животным.

В последнем случае различные субклеточные частицы отделяют путем простого подбора величин ускорения и времени центрифугирования, поскольку их плотность неодинакова. Сравнительно быстро оседают большие фрагменты клеток (оболочка) и их ядра, за ними следуют митохондрии, микросомы, представляющие собой везикулы эндоплазматической сети. Полимиксиновые антибиотики, например, весьма прочно связываются фосфолипидами клеточных мембран почек, головного мозга, печени и мышц. Связанную часть, при этом, удается отделить только экстракцией хлороформом. При этом в тех же органах присутствует и некоторое количество несвязанного препарата. Аминогликозиды также связываются с невыясненным компонентом в клетках канальцев почки. Предполагается, что такие связывания, наблюдаемые в обоих случаях, ответственны за токсические свойства препаратов [75].

Связывающей способностью обладают не только мембраны клетки, но и белки цитоплазмы. Так, в цитоплазме клеток печени обнаружен белок лигандин, активно связывающий билирубин, бромсульфоталеин, беталактамы, антибиотики,

хлорамфиникол и др. Здесь же осуществляется связывание полимиксина, рифамицина, однако не с лигандином, а с другим неустановленным белком. Имеются данные о том, что в гомогенатах гепатоцитов канамицин преимущественно связывается митохондриями и ядрами. Митохондриальная фракция оказалась наиболее активной по отношению к бензилпенициллину [122].

Нами проведен цикл исследований по субклеточному распределению нитразепама и феназепама в некоторых органах экспериментальных животных. При этом особое внимание было уделено не только исходным препаратам, но их метаболитам.

Нитразепам, содержащий в своей молекуле нитрогруппу, превращается в организме в аминопроизводное, которое в свою очередь, образует ацетилированный метаболит. Эти реакции катализируются, соответственно, нитроредуктазой (раздел 8.2.1) и N-ацетилтрансферазой (раздел 8.4). Сопоставление данных по внутриклеточной локализации нитразепама в гепатоцитах свидетельствует об относительно равномерном его распределении в оболочках клеток, растворенной фракции и несколько более низком в митохондриях, микросомах и ядре. Довольно высокая концентрация восстановленного производного отмечена в растворимой и микросомальной фракциях [123]. Полученные результаты согласуются с данными о локализации нитроредуктаз в этих фракциях, а отсюда преимущественном восстановлении нитразепама в них. Наибольшее количество ацетильного производного нитразепама обнаружено нами в митохондриях. По-видимому, это объясняется тем, что ферментативное ацетилирование соответствующего субстрата осуществляется в митохондриях с участием коэнзима А. В опытах *in vitro* мы убедились в правильности нашего суждения [124]. Об этом свидетельствует и тот факт, что в аналогичных опытах с клетками легких нами не обнаружено избирательного распределения нитразепама и его метаболитов. Это и не удивительно, так как такие клетки обладают низкой нитроредуктазной и N-ацетилтрансферазной активностями.

Если для нитразепама отмечено каскадное ферментативное превращение, т. е. исходное вещество образует аминопроизводное, которое затем ацетируется, то для феназепама характерно одновременное окисление по двум положениям молекулы. Исследование каталитических свойств монооксигеназ, катализирующих метаболизм феназепама, показало [125], что гепатоциты крыс с большой скоростью окисляют ароматическое ядро, в то время как мышей — гетероциклическое. Эти различия связаны с определенными изоформами цитохрома Р450. При анализе данных по распределению феназепама в гепатоцитах экспериментальных животных отмечено, что наибольшее содержание исходного препарата и его метаболитов наблюдается в микросомальной фракции, где и локализованы цитохром Р450-зависимые ферменты [126].

Настоящие исследования позволяют нам сделать вывод о том, что избирательное внутриклеточное распределение лекарств зависит и от метаболической активности определенных органелл, в которых ферменты, имеющие сродство к субстрату, играют роль связывающего белка.

7.2.5. ОБЪЕМ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ

С понятием камеры (компартамента или отсека) тесно связано понятие объема. Отделы организма могут рассматриваться как реальные объемы возможного распределения, несмотря на их условное членение (рис. 7.1, 7.3). Многие препараты находятся не только внутри объема, но могут связываться с поверхностью клеток и межклеточными макромолекулами этого отдела организма.

Объем распределения (V_d) относится к одной из фундаментальных характеристик, использующихся в фармакокинетических исследованиях и представляет собой экспериментальный метод.

Объем распределения лекарственного вещества — это кажущийся объем, в котором оно распределяется при условии, что концентрация его в организме была бы равна концентрации его в плазме, т. е. весь организм представляет собой как бы единую камеру.

Такому заключению можно найти объяснение. Распределение из плазмы в другие тканевые среды организма, как указывалось выше, имеет свои особенности для каждого препарата, попадающего в кровеносное русло. Точную концентрацию можно определить различными аналитическими методами в различных органах и тканях экспериментальных животных. У человека концентрацию препарата определяют в основном в плазме.

Для оценки объема распределения лекарства в организме используется принцип, лежащий в основе определения объема распределения препарата в изолированном сосуде, заполненном жидкостью. Масса введенного в сосуд препарата, разделенная на его концентрацию после смешивания, дает представление об объеме его распределения, а также об объеме сосуда.

Подобным образом объем распределения препарата в организме представляет собой отношение: а) определенной дозы вещества после его однократного струйного внутривенного введения (болюс) к его концентрации; или б) количество препарата, находящегося в организме при постоянном его приеме, к стабильной концентрации в плазме, величине постоянной [54].

Исходя из представленных рассуждений, в основном объем распределения препарата связывает его количество (дозу) в организме с концентрацией (C) в крови или плазме:

$$V_d = \frac{\text{Доза}}{C}.$$

Несомненно, такое выражение несколько условно по отношению к пунктам а и б. Например, при болюсном введении объем распределения зависит от времени, прошедшего после введения. Он увеличивается по сравнению с начальным значением,

равным отношению дозы к концентрации, до максимального значения в терминальной фазе кривой «концентрация-время». Количество препарата в организме для определения V_d в стабильном состоянии при регулярном приеме препарата непосредственно оценить довольно трудно (пункт б). Поэтому используется несколько иной математический аппарат, включающий понятие общего клиренса [127].

Основная размерность V_d — объемные единицы — т. е. литры, миллилитры. В ряде случаев этот параметр, выраженный в объемных единицах, относят к массе или поверхности тела экспериментальных животных или человека (л/м^2 , мл/м^2). Нередко V_d выражают в процентах от объема биологических жидкостей организма.

Кажущийся объем распределения препарата не эквивалентен физиологическому объему тканей, объединяемых понятием камеры, а имеет лишь формальный смысл указанной пропорциональности. В действительности для некоторых лекарственных веществ, в значительной степени связывающихся в тканях V_d , рассчитываемый на основании остаточной низкой концентрации в плазме крови, во много раз превышает общий объем организма.

Формальный смысл понятия кажущегося объема распределения лекарств в некоторых случаях не мешает сопоставлять значения этого параметра с реальным объемом некоторых биологических жидкостей организма. Так, V_d антибиотиков группы аминогликозидов, которые слабо растворимы в липидах, близок объему внеклеточной жидкости человека, а аналогичный показатель тетрациклинов, хорошо растворимых в липидах, значительно выше объема внеклеточной жидкости. Следовательно, первые препараты слабо проникают в клетку, и наоборот, вторые — интенсивно.

У человека концентрацию препарата определяют в плазме. Ее сопоставляют с введенной дозой, и, таким образом, решают вопрос о его распределении в организме с учетом нахождения в системе кровообращения или с переходом из плазмы в ткани.

Если лекарственное вещество остается преимущественно в плазме, то V_d приблизительно равен объему плазмы, т. е. небольшой. Если же оно распределяется в большинстве тканей, то V_d будет большим. Подобная информация важна для клинициста, в частности при передозировке препарата.

В многочастевых моделях (раздел 10.4) вводят понятие объема распределения в i -й камере (обозначение V_i , размерность — л, мл). Например, при анализе двухчастевой модели рассчитывают объем первой, центральной камеры (V_i), в которую входит и плазма крови. Общий, или кинетический объем распределения в таких моделях (обозначение V_β , размерность — л, мл) характеризует распределение препарата после достижения квазистационарного равновесия между концентрацией препарата в крови (центральной камере) и других тканях (периферических камерах). Для двухчастевой модели справедливо выражение $V_\beta = (k_{el}/\beta)V_1$; для этой модели предложено также использовать параметр «стационарный объем распределения» (обозначение V_{ss} , размерность — л, мл), который пропорционален величине объема распределения в первой камере.

МЕТАБОЛИЗМ

В некоторых случаях качественное и особенно количественное установление фармакологической активности или спектра действия биологически активных соединений сопряжено с определенными трудностями. Все они могут быть сведены к следующим группам [128, 129].

1. Отсутствует зависимость «доза—эффект» при однократном введении вещества экспериментальным животным.

2. Зависимость «доза—эффект» имеет ступенчатый или нелинейный характер в условиях длительного введения вещества.

3. Наблюдаются видовые и особенно половые отличия в фармакокинетическом и токсикологическом экспериментах.

4. Необычное проявление фармакологического действия при внутривенном введении соединения.

5. Отсутствует *in vitro* эффект, наблюдаемый в опытах *in vivo*.

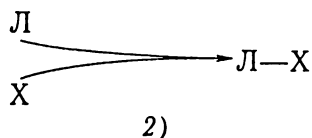
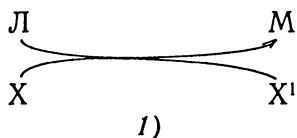
6. Отсутствует исходный препарат в биологических жидкостях или в органах-мишенях во время проявления эффекта.

7. Усиление или ослабление фармакодинамических свойств вещества индукторами или ингибиторами ферментов, катализирующих метаболизм лекарств.

Все перечисленные проблемы сопряжены с биологическими факторами, связанными с наличием ферментов в организме животных и человека, субстратами которых являются лекарства.

Метаболические превращения химических веществ в организме возможны благодаря фундаментальным свойствам молекул, заключающихся в их способности к реакциям. Они могут протекать медленно или быстро, быть внутримолекулярными или с участием других веществ.

В организме возникают две ситуации, когда лекарство (Л) реагирует с химическими (Х) компонентами клетки:



В случае 1) происходит ферментативная активация Л и Х с образованием в конечном счете метаболита (М). В случае 2) Л и Х ковалентно связываются между собой и образуют аддукты (Л—Х). Оба продукта реакции — М и Л—Х — представляют собой разновидности метаболитов.

В соответствии с природой химических веществ, с которыми реагирует в организме лекарственное вещество или его метаболит, все реакции метаболизма можно свести к трем случаям: 1) Неферментативное (химическое) взаимодействие лекарств с химическими низко- и высокомолекулярными веществами неферментной природы; 2) Ферментативное, наиболее часто встречающееся в организме; 3) Постферментативное, которое включает ферментативное образование реакционноспособных метаболитов, которые за счет спонтанных перегруппировок образуют конечные метаболиты, либо взаимодействуют с биологическими макромолекулами.

Следует также отметить, что в ряде случаев как в ферментативной, так и химической стадии метаболизма лекарства может происходить образование активных форм кислорода, участвующих в реакциях с биомолекулами клетки.

В химических реакциях особое значение имеет реакционная способность реагирующих веществ (субстратов и реагентов), зависящая от относительной доступности электронов (электронной плотности) определенных связей или определенных атомов. Существует ряд факторов, обусловленных строением вещества, способного влиять на доступность электрона в связях и в отдельных атомах. Сюда относятся индуктивный, а также мезомерный эффекты, способствующие поляризации молекул

в активном состоянии и потому опирающиеся на физические свойства молекул. Существенные различия между индуктивными и мезомерными эффектами заключаются в том, что первые характерны в основном для насыщенных групп или соединений, в то время как вторые проявляются в ненасыщенных, особенно в сопряженных соединениях. Как индуктивные, так и мезомерные эффекты влияют на свойства веществ как в статическом, так и в динамическом состояниях. Они сказываются на положении равновесия (разделы 1.2 и 2.1), на скорости реакций (раздел 4.2), на силе кислот и оснований (раздел 2.1.1). Влияние перечисленных факторов может, однако, изменяться или полностью инвертироваться под влиянием стерических факторов (раздел 3.3). Так называемый стерический эффект проявляется в форме пространственных затруднений, при которых реакционная способность того или иного участка молекулы определяется не столько характером распределения электронов, сколько просто размерами отдельных функциональных групп [19, 20].

В органической химии принято выделять четыре основных типа реакций, в которых могут принимать участие органические соединения: 1) реакции замещения; 2) реакции присоединения; 3) реакции отщепления (элиминации); 4) реакции перегруппировки.

В реакциях первого типа замещение происходит у атома углерода. Оно может быть электрофильным, например классическое ароматическое замещение атома водорода, или нуклеофильным, когда вытесняется атом или группа атомов других элементов.

Реакции присоединения могут быть электрофильными, нуклеофильными или радикальными в зависимости от природы частиц, инициирующих процесс.

К электрофильным относятся реакции, в которых атакующий агент находит участок субстрата, в котором электроны легко доступны. В этом случае атакующие агенты носят название электрофилов. В нуклеофильной реакции атакующий агент

ищет участок, в котором заряд атомного ядра не полностью скомпенсирован орбитальными электронами и способен поэтому к присоединению; такие агенты носят название нуклеофилов. Следовательно, электрофилы и нуклеофилы в реакциях можно рассматривать, соответственно, как акцепторы и доноры электронных пар, принимающие их от одних атомов или отдающие их другим атомам. Такими атомами чаще всего являются атомы углерода. Таким образом, электрофильные и нуклеофильные реакции можно рассматривать также как частный случай окислительных и восстановительных процессов, поскольку электрофилы являются акцепторами, а нуклеофилы — донорами электронов.

Реакции отщепления представляют собой, как правило, не что иное как обращенные реакции присоединения.

Перегруппировка также может протекать через промежуточные соединения, представляющие собой катионы, анионы или радикалы. Чаще всего такими промежуточными соединениями являются карбониевые ионы (атом углерода в молекуле несет положительный заряд) или другие электродефицитные структуры. Перегруппировки могут включать либо просто миграцию функциональной группы, либо частичную перегруппировку углеродного скелета. Вслед за стадией истинной перегруппировки часто следуют реакции замещения, присоединения или отщепления, приводящие, в конечном счете, к образованию устойчивого продукта.

В целом химические реакции вносят определяющий вклад в общие процессы метаболизма лекарственных средств, однако они незначительны. К ним можно отнести некоторые процессы взаимодействия с макромолекулами, в том числе и ферментами, а также с низкомолекулярными биомолекулами, другими ксенобиотиками и H_2O , H^+ , OH^- , PO_4^{3-} .

Большинство органических соединений в клетке отличаются значительной стабильностью при физиологических значениях температуры, давления и pH. Объясняется это отсутствием реакций между соответствующими веществами, так как не возникает

активированный комплекс. Для того, чтобы такой активированный комплекс возник, соударяющиеся молекулы должны обладать некоторым минимальным достаточным для этого количеством энергии. Так, при повышении температуры все большее число молекул приобретает этот минимум энергии и, соответственно, возрастает скорость реакции. Обычно химики-органики для ускорения реакций прибегают именно к этому средству, т. е. повышению температуры, хотя иногда они изменяют также давление или работают при крайних значениях pH. По-иному обстоит дело в клетке: здесь эти реакции протекают при умеренной температуре, низком давлении и значениях pH, близких к нейтральному, однако скорость их, несмотря на это, часто бывает весьма значительной. Происходит это благодаря специфическому биологическому катализу, который осуществляется ферментами (раздел 4.2). Будучи белками, большинство ферментов в клетке функционируют связанными с мембранами. На это есть множество причин. Одни из них используют гидрофобную область мембраны как среду, в которой протекает реакция, другие приобретают в составе мембраны специфические свойства, которые теряются при солюбилизации мембраны детергентами.

Для многих ферментов доказано, что они располагаются в мембране в определенном порядке, который делает возможным последовательное протекание реакций метаболического цикла.

Следовательно, для осуществления ферментативного катализа метаболического превращения лекарства оно должно проникнуть в соответствующий компартмент (отсек) мембраны, а затем взаимодействовать с ферментом.

В классической биохимии, согласно международной классификации ферментов (МКФ), они разделены на шесть классов в зависимости от типа катализируемой реакции (оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы).

В биохимии чужеродных соединений все реакции метаболизма ксенобиотиков условно разделены на две группы:

1) Реакции *функционализации*, включающие процессы *окисления, восстановления и гидролиза* субстратов. В результате этих реакций в молекулу вещества вводится новая функциональная группа или усложняется старая;

2) Реакции *синтеза* или *конъюгации*. В этой стадии метаболизма лекарства функциональная группа маскируется в результате присоединения новой.

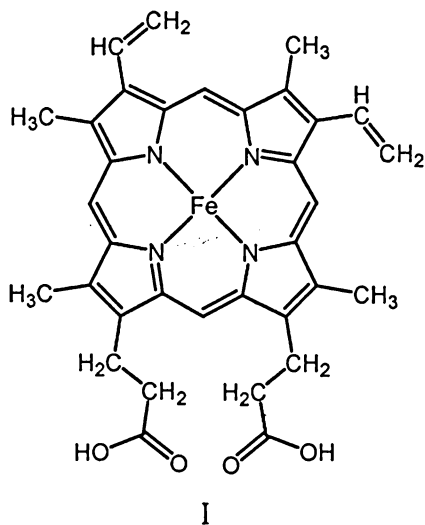
8.1. ОКИСЛЕНИЕ

В живой клетке окисление лекарственных средств, как, собственно, и других ксенобиотиков, протекает с участием молекулярного кислорода или в процессе дегидрирования, что напоминает окислительно-восстановительные реакции, характерные для эндогенных веществ.

Реакции кислорода можно условно разделить на два больших класса: к первому относятся реакции, при которых кислород сам присоединяется к субстрату (реакции внедрения), ко второму относятся реакции, при которых кислород служит просто окислителем, и в зависимости от природы и условий реакции восстанавливается до перекиси водорода или до воды. Последний тип реакций называют реакциями без внедрения. В связи с обсуждаемой проблемой наибольший интерес представляют реакции неполного внедрения кислорода. В этом случае образуется связь $O-O$, а кислород входит в состав субстрата в виде гидроксильной группы. Отсюда и название процесса — реакция гидроксилирования. Сам фермент, катализирующий данный процесс, называется монооксигеназой, указывая на то, что в процессе окисления в субстрат вводится один атом кислорода, а второй восстанавливается до воды. При полном внедрении кислорода образуются устойчивые промежуточные радикалы или циклические перекиси и катализируют этот процесс диоксигеназы микроорганизмов [20, 84].

8.1.1. ЖЕЛЕЗОПОРФИРИНОВЫЕ ФЕРМЕНТЫ

Основная часть активного кислорода, используемого в реакциях гидроксилирования ксенобиотиков, генерируется гемопротеинами, большинство из которых — ферменты. В качестве простетической группы они содержат железопорфирины (миоглобин, гемоглобин, цитохром Р450, каталаза, пероксидаза, циклооксигеназа и гемоксигеназа). Железопорфирином для них является гем *b*. В случае Fe^{2+} это протогем или гем, а Fe^{3+} — протогемин или гемин (I).



Взаимодействие простетической группы с апоферментом (белковой частью) гемопротеинов определяет их спектральные, магнитные, химические и функциональные характеристики. В спектрах поглощения гемопротеинов имеются три полосы — α , β и γ . Все они, за исключением цитохрома Р450 в восстановленной форме в комплексе с СО поглощают при 420 нм. Для последнего эта величина составляет 420 нм и 450 нм.

Поскольку для иона железа характерно координационное число шесть, по обе стороны от гема два свободных места могут занимать лигандами железа. Значение химической структуры аксиального (пятого) лиганда гемопротеинов чрезвычайно велико. Он прежде всего определяет окислительно-восстановительные потенциалы пары $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, с которыми, как известно, связаны процессы активации кислорода.

8.1.1.1. ЦИТОХРОМ Р450-ЗАВИСИМЫЕ МОНООКСИГЕНАЗЫ

В 1955 году Гарфинкель [130] и Клингенберг [131] установили, что эндоплазматическая сеть печени экспериментальных животных содержит неизвестное вещество, которое, восстанавливаясь, присоединяет окись углерода и образует комплекс с максимумом поглощения при 450 нм. Позже это соединение было названо Р450, а когда была определена его гемопротеиновая природа — цитохромом Р450.

Впоследствии оказалось, что цитохром Р450 является простетической группой ферментов, относящихся к *монооксигеназам* (гидроксилазам). Они широко распространены в живой природе [84], так как обнаружены в различных таксономических группах (беспозвоночные, позвоночные, растения, бактерии). Их локализация у животных не ограничивается печенью, а включает широкий круг органов и тканей.

Монооксигеназы, в которых роль простетической группы выполняет цитохром Р450, в зависимости от места локализации можно разделить на три группы [132]:

- 1) Микросомы печени: НАДФН \rightarrow Флавопротеид II \rightarrow Негеминовый Fe-белок \rightarrow Цитохром Р450 \rightarrow O₂;
- 2) Митохондрии надпочечников: НАДФН \rightarrow Флавопротеид III \rightarrow Аденодоксин \rightarrow Цитохром Р450 \rightarrow O₂;
- 3) Бактериальные монооксигеназы: НАДФН \rightarrow Флавопротеид III \rightarrow Путидаредоксин \rightarrow Цитохром Р450 \rightarrow O₂.

В гемоглобине 5-е положение гема занято имдазольной группой гистидина, а 6-е остается незамещенным, либо замещается кислородом. Природа 5-го и 6-го лигандов в цитохроме Р450 окончательно не выяснена. Известно, что системы, где 5-м лигандом является атом серы, а 6-м — азот имидазола, лучше всего моделируют свойства этого гемопротеина [28]. Следует отметить, что в настоящее время, исходя из неполного соответствия гемопротеина классу цитохромов, Номенклатурной

Комиссией Международного Союза биохимиков и Молекулярных биологов (NC-IUBMB) рекомендовано этот фермент называть гемитиолатный фермент P450 вместо цитохром P450.

Несмотря на то, что цитохром P450-зависимые ферменты из разнообразных источников отличаются друг от друга, существует определенная последовательность реакций, при которых гемопротеин взаимодействует с субстратами, кислородом и донорами электронов (рис. 8.1).

Обычно такое взаимодействие условно можно разделить на 5 отдельных стадий [132]:

1. Взаимодействие низкоспиновой формы цитохрома P450 (Fe^{3+}) с субстратом:

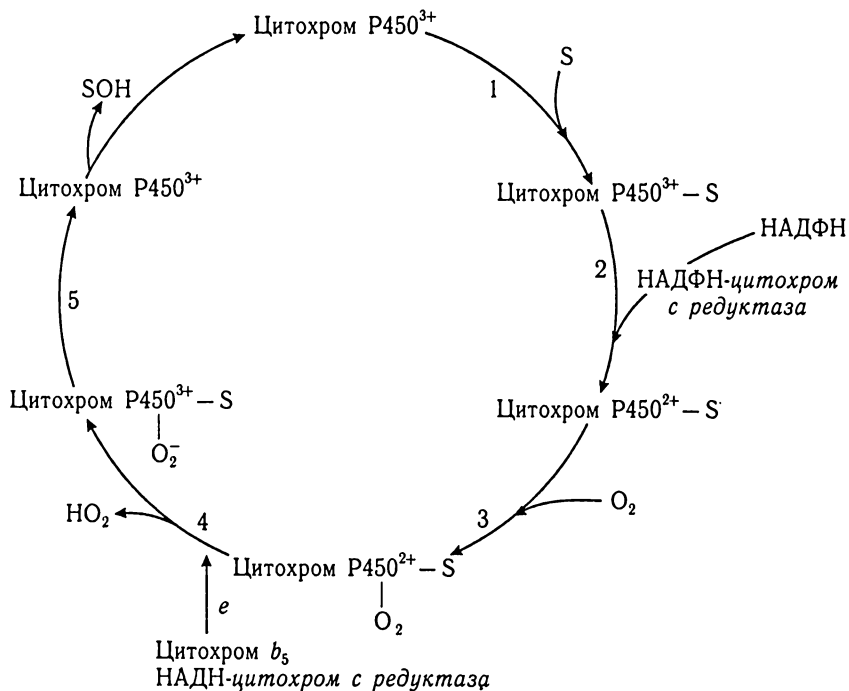


Рис. 8.1. Схема реакций гидроксилирования ксенобиотиков

2. Восстановление образовавшегося фермент-субстратного комплекса в НАДФН — специфической цепи переноса электронов;

3. Взаимодействие атмосферного кислорода с комплексом цитохром Р450 (Fe^{3+})—субстрат и образование тройственного комплекса цитохром Р450 (Fe^{3+})—субстрат— O_2 ;

4. Активирование молекулярного кислорода в оксигенированном комплексе путем его восстановления;

5. Распад комплекса на окисленный цитохром Р450 и окисленный субстрат.

Число субстратов, вовлекающихся в монооксигеназный катализ, очень велико. Поэтому принято подразделять его на определенные типы реакций (табл. 8.1).

Таблица 8.1

Типы реакций монооксигеназного катализа

Алифатическое гидроксилирование	$\text{R}-\text{CH}_3 \rightarrow \text{R}-\text{CH}_2\text{OH}$
Ароматическое гидроксилирование	$\text{R}-\text{C}_6\text{H}_5 \rightarrow \text{R}-\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$
Эпоксидирование	$\text{R}-\text{CH}=\text{CH}-\text{R} \rightarrow \text{R}-\text{CH} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \end{array} \text{CH}-\text{R}$
Окислительное деалкилирование	
N-деалкилирование	$\text{R}-\text{NHCH}_3 \rightarrow \text{R}-\text{NH}_2 + \text{CH}_2\text{O}$
O-деалкилирование	$\text{R}-\text{O}-\text{CH}_3 \rightarrow \text{R}-\text{OH} + \text{CH}_2\text{O}$
S-деалкилирование	$\text{R}-\text{S}-\text{CH}_3 \rightarrow \text{R}-\text{SH} + \text{CH}_2\text{O}$
N-окисление	
Первичные амины	$\text{R}-\text{NH}_2 \rightarrow \text{RNHOH}$
Вторичные амины	$\text{R}_1\text{R}_2-\text{NH} \rightarrow \text{R}_1\text{R}_2-\text{NOH}$
Третичные амины	$\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3-\text{N} \rightarrow \text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3-\text{N}=\text{O}$
S-окисление	$\text{R}_1\text{R}_2-\text{S} \rightarrow \text{R}_1\text{R}_2-\text{S}=\text{O}$
Дезаминирование	$\text{R}-\text{CH} \begin{array}{c} \diagup \text{NH}_2 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{array} \rightarrow \text{R}-\text{C} \begin{array}{c} \text{O} \\ \end{array} \text{CH}_3 + \text{NH}_3$
Десульфирование	$\text{R}_1\text{R}_2-\text{C}=\text{S} \rightarrow \text{R}_1\text{R}_2-\text{C}=\text{O}$
Дегалогенирование	$\text{R}-\text{CH}_2\text{Cl} \rightarrow \text{R}-\text{CH}_2\text{OH}$

Из химической структуры субстратов и продуктов их окисления (метаболитов) очевидно, что такие реакции могут осуществляться как с эндогенными, так и с чужеродными (ксенобиотиками) веществами. К первой группе относятся стероиды, жирные кислоты, желчные кислоты, простагландины, лейкотриены, биогенные амины, ретиноиды, гидроперикиси липидов [133, 134].

Ко второй группе относятся многие синтетические и природные лекарственные средства, пестициды, гербициды, промышленные яды, отходы промышленных предприятий, пищевые добавки, косметические составы и т. д. [84].

С физиологической точки зрения, реакции гидроксилирования ксенобиотиков направлены на защиту живых систем от накопления в них гидрофобных соединений. Однако во многих случаях эти реакции приводят к образованию промежуточных реакционноспособных активных метаболитов, продуктов неполного восстановления кислорода, которые химически модифицируют макромолекулы и стимулируют реакции перекисного окисления. Все это служит причиной проявления различных видов токсичности, канцерогенеза, мутагенеза, тератогенеза и аллергий.

Следовательно, цитохромы P450 играют чрезвычайно важную роль в поддержании стационарного уровня эндогенных лигандов, вызывая лигандомодулирующую транскрипцию генов, определяя тем самым рост, дифференциацию, апоптоз, а также клеточный гомеостаз и нейрогуморальную функцию.

Исходя из общих положений биохимии о субстратной специфичности ферментов (абсолютная и относительно широкая) все же трудно предположить даже для второго случая, что каталитическое окисление столь многочисленных по химической структуре субстратов может осуществляться одним цитохромом P450-зависимым ферментом.

Вначале для доказательства существования цитохрома P450 в различных изоформах были использованы его индукторы. Количество веществ, вызывающих индукцию монооксигеназ, окисляющих ксенобиотики, превышает несколько сотен [20].

Это различные по химической природе и биологическому действию соединения. Единственным общим свойством для них являются то, что они жирорастворимы и в значительных количествах накапливаются в эндоплазматической сети клеток. Такое избирательное поступление веществ в цитомембраны способствует взаимодействию фермента с субстратом. Чем дольше субстрат находится в организме, тем продолжительнее его контакт с ферментом, и, следовательно, более высок уровень его индукции. Можно предположить, что индукция в своей основе носит приспособительный характер, так как приводит к увеличению скорости метаболизма ксенобиотиков, то есть к ускорению их элиминации из организма (разделы 4.2.1, 10.2.3).

Исследования, проведенные с классическими индукторами (фенobarбитал, 3-метилхолантрен) цитохрома P450, а также спектральные характеристики комплексов фермент-субстрат показали, что в одном и том же биологическом объекте этот гемопротейн существует в нескольких разновидностях. Такое заключение приводит к дальнейшим вопросам, касающимся прежде всего количества этих изоферментов и возможности их классификации.

Оказалось, что множественные формы цитохрома P450 в сравнении с другими ферментами имеют относительно невысокую субстратную специфичность и часто один и тот же субстрат окисляется различными изоформами. К сожалению, отсутствуют и специфические по отношению к тем или иным изоформам цитохрома индукторы или ингибиторы. Все это затрудняло классификацию изоформ цитохрома P450.

8.1.1.1.1. КЛАССИФИКАЦИЯ ИЗОФОРМ ЦИТОХРОМА P450

Бурное развитие в последнее время молекулярной биологии и генетики позволило решить некоторые сложные вопросы обсуждаемой проблемы. Исходными критериями послужили

общеизвестные биологические закономерности. Прежде всего это касается того, что регуляторные механизмы клетки определяются, в конечном счете, генами и их продуктами. Внутри клетки происходит непрерывная транскрипция многих генов, хотя часть генома может не проявляться. К факторам, определяющим скорость синтеза ферментов на рибосомах и в цитоплазме, относятся как скорость транскрипции, так и скорость деградации молекул мРНК. Таким образом, гены контролируют определенные метаболические реакции, регулируя биосинтез ферментов. Это нашло отражение в утверждении «один ген — один фермент». Следовательно, биосинтез различных форм цитохрома P450 должен находиться под генетическим контролем и они должны отличаться друг от друга только аминокислотной последовательностью. Одни из них могут быть *конститутивными*, образующимися независимо от того, в каких условиях находится клетка, другие — *индуцибельные*, часто синтезирующиеся в следовых количествах и достигающие определенного уровня при наличии эндогенных или экзогенных субстратов. Для некоторых изоформ цитохрома P450 наблюдается явление *импринтинга*, заключающееся в том, что после введения в пренатальном периоде индуктора (фенобарбитал) соответствующие значения гемопroteина в печени животных сохраняются и при достижении половой зрелости. В этом случае происходит необратимая индукция этих ферментов [135]. Следует отметить, что для некоторых конститутивных изоформ ферментов также наблюдается явление индукции, а для других оно отсутствует. Поэтому для изоформ цитохрома P450 характерной особенностью является экспрессия генов. Транскрипционная активация отдельных генов начинается на различных стадиях развития организма и зависит от пола, вида животных и типа их тканей [136].

Несмотря на то, что процесс индукции цитохрома P450 известен уже более сорока лет, его механизм установлен совсем недавно, благодаря широкомасштабным исследованиям CYP1A1. Оказалось, что для этой изоформы фермента индукторами

являются полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). Они способны присоединяться к специфическому цитозольному ПАУ-рецептору (Ah) с последующим перемещением в ядро клетки (раздел 10.2.3). Последующий транскрипционный процесс включает стадии: 1) лиганд-зависимое взаимодействие (гетеродимеризация между Ah-рецептором и соответствующим ядерным переносчиком; 2) взаимодействие гетеродимера с ксенобиотик-чувствительным энхансером; 3) передача индуктивного сигнала от энхансера к промотору CYP1A4; 4) перестройка хроматиновых структур. Заканчивается процесс трансформацией мРНК и синтезом полипептидной цепи (трансляция) на матрице иРНК с участием рибосом и других компонентов белок-синтезирующей системы [137].

Гормон роста, глюкокортикоиды и тиреоидные гормоны в значительной степени способны модулировать экспрессию генов [138].

Методами белковой химии (очистка ферментов, определение аминокислотного состава и др.), а также молекулярной биологии и (иммунохимические методы) в настоящее время установлено большое количество изоформ цитохрома P450, а отсюда и их генов. Количество таких генов в настоящее время составляет около 500. Они обнаружены в 85 видах эукариот (беспозвоночные, позвоночные, растения, грибы) и 20 видах прокариот.

Благодаря рентгеноструктурному анализу, а также технике гомологического моделирования [139] было установлено строение *A*-, *B*-, *F*-, *J*-субъединиц и трехмерное расположение активного центра многих представителей цитохрома P450. Особое внимание при этом уделяется отдельной аминокислоте, например, Asp301 в CYP2D6, являющейся решающей в формировании активного центра фермента. Она участвует в образовании водородных связей с атомом азота субстратов (или ингибиторов).

Молекулярная масса гемопротеинов колеблется незначительно (CYP1A2 — 58 кД, CYP1B1 — 60 кД, CYP2B6 — 56 кД).

Белковая часть различных изоформ цитохрома P450 отличается аминокислотным составом (CYP1A2 — 515 остатков, CYP1B1 — 543, CYP2B6 — 491), но все они имеют консервативный участок у концевой карбоксильной группы, содержащий 26 аминокислотных остатков.

Учитывая общность происхождения генов и принципы подобия аминокислотного состава белковой молекулы изоформ цитохрома P450 было предложено использовать эту закономерность для их классификации [140].

Для обозначения цитохромов P450 используют аббревиатуру CYP. Гены и продукты их экспрессии (мРНК, кДНК) также обозначаются CYP. Исключения составляют гены мышей и дрозофил (Cyp). Все цитохромы P450 называются суперсемейством, которое подразделяется на семейства. Сюда входят белки, которые имеют около 40 % подобия аминокислотного состава и обозначаются цифрой (1; 2; 3 и т. д.). Подсемейства — белки с подобием 65 %. Для их обозначения используют буквы латинского алфавита (A, B, C, и т. д.). Внутри подсемейства белки имеют сходство более чем на 65 % и это, как правило, индивидуальные ферменты (изоформы). Они обозначаются цифрой, стоящей после буквы (1A1; 3B3; и т. д.). К настоящему моменту известно около 120 семейств цитохромов P450 (табл. 8.2).

Такая классификация имеет ряд неудобств и трудностей. Это касается, например, тривиальных наименований генов, которые были открыты ранее, а позже была установлена их роль в кодировании цитохрома P450.

Например, для *Drosophila melanogaster* и *Arabidopsis thaliana* определен ген Eig 17—1, который является не чем иным, как cyp18. Следовательно, Cyp становится официальным синонимом. Во многих публикациях использована старая номенклатура гемопротеинов, основанная на видовых особенностях («olf 1» и «II C 16» кодируются соответственно крысиными CYP2Y1 и кроличьими CYP2C16 генами). В банке данных также существует переход от старых наименований монооксигеназ,

Таблица 8.2

**Общая характеристика семейств цитохрома P450 различных
таксономических групп организмов**

CYP1	Позвоночные: индуцируются диоксином; метаболизм полициклических углеводов, гетероциклических соединений, ароматических аминов
CYP2	Позвоночные и беспозвоночные: метаболизм лекарств и химических веществ окружающей среды
CYP3	Позвоночные: метаболизм лекарств и химических веществ окружающей среды
CYP4	Позвоночные: гидроксирование жирных кислот; беспозвоночные: неизвестные функции
CYP5	Позвоночные: тромбоксансинтаза Насекомые: метаболизм веществ растительного происхождения и пестицидов
CYP6	Насекомые: метаболизм веществ растительного происхождения и пестицидов
CYP7A	Позвоночные: холестерин 7 α -гидроксилаза
CYP7B	Позвоночные: неизвестные функции
CYP8	Позвоночные: простаглицинсинтаза
CYP9	Насекомые
CYP10	Моллюски (митохондриальные ферменты)
CYP11	Позвоночные: расщепление боковой цепи холестерина, стероид 11 β -гидроксилаза и альдостеронсинтаза (митохондрии)
CYP12	Насекомые (митохондриальные ферменты)
CYP13	Нематоды
CYP14	Нематоды
CYP15	Насекомые
CYP16	Нематоды
CYP17	Позвоночные: стероид 17 α -гидроксилаза
CYP18	Насекомые

CYP19	Позвоночные: ароматизация андрогенов
CYP21	Позвоночные: стероид 21-гидроксилаза
CYP24	Позвоночные: стероид 24-гидроксилаза (митохондрии)
CYP27	Позвоночные: стероид 27-гидроксилаза (митохондрии)
CYP51	Животные, грибы, дрожжи, растения, биосинтез стероидов
CYP52	Дрожжи: гидроксилирование алканов
CYP53—CYP62	Грибы
CYP71—CYP92	Растения
CYP73	Растения: гидроксилирование коричной кислоты
CYP101—CYP118	Бактерии

катализирующих гидроксилирование стероидов, на новую классификацию. Например, P450_{scc}, P450_{11b1}, P450_{11b2}, P450_{agom} могут называться P450_{scc}, P450_{c11b1}, P450_{c11b2}, P450_{agom}, но правильнее — CYP11B1, CYP11B2, CYP17 соответственно.

В настоящее время методы молекулярной биологии позволяют осуществлять различные манипуляции генетическими элементами. Они включают внедрение генов клонированием рекомбинантных молекул ДНК, сконструированных *in vitro*. Образующуюся при этом гибридную молекулу ДНК можно затем клонировать *in vivo*. Новая методология позволяет выделить индивидуальные фрагменты ДНК (гены) из любого источника в больших количествах. Благодаря таким находкам удалось получить изоформы цитохромов P450, отличающиеся аминокислотной последовательностью от природных гемопротеинов. В данном случае рекомендовано использовать следующую номенклатуру. Вначале указывается природная изоформа цитохрома P450, затем идет аббревиатура X###Y, где X — аминокислотная последовательность в его участке ###, а Y — замена в этом участке одной или более аминокислот на другие в реконструированном (химерном) гемопротеине. Например,

CYP1A11426V свидетельствует о том, что в CYP1A1 в положении 426 изолейцин заменен валином.

Наличие столь разнообразной информации об изоформах цитохрома P450 послужило основой для построения филогенетического дерева эволюции этих белков. Известно, что функционально те же самые ферменты из филогенетически удаленных видов сохраняют общие элементы структуры, но могут иметь существенно различающиеся последовательности. Однако существенным для таких белков является то, что они не имеют изменений аминокислотной последовательности в области активного центра. Вероятно, любое изменение на этом участке либо изменяет его стерическое соответствие и способность связывать субстрат, либо приводит к утрате той группы, которая принимает участие в каталитическом процессе. Следовательно, передачу признаков с модификацией можно легко оценить по дивергенции аминокислотной последовательности гомологичных белков, т. е. на основе вычисленного количества мутаций в кодонах. По-видимому, темп мутаций, проявляющийся в аминокислотной последовательности, меняется во времени и различен для разных семейств [141].

Существуют несколько схем, определяющих родство отдельных семейств цитохромов P450 [142—144]. В наиболее распространенной и общепризнанной [140] основные семейства или отдельные изоформы разбиты на восемь (I—VIII) групп, которые последовательно связаны друг с другом. Основаны они на гомологиях в полипептидных цепях. К I группе (5 генов) относятся гемопротейны (четыре), присутствующие в организмах позвоночных животных, а CYP18 обнаружен только у насекомых. Группа II представлена кластером генов (13), встречающихся у растений. Группа III (6 генов) характерна для беспозвоночных животных. К группе IV (5 генов) относятся цитохромы P450, катализирующие окисление жирных кислот в организмах прокариот и эукариот. Гены (семь) группы V кодируют митохондриальные цитохромы P450, в большей части, обеспечивающие окисление стероидов. 4 Гена, объединенных

в группу VI, относятся к растительным. 6 генов группы VII наблюдаются только у грибов. В группе VII (7 генов) объединены цитохромы P450, находящиеся в различных таксономических группах. Интересно, что ген ароматазы млекопитающих CYP19 гомологичен CYP86A1, изолированной из *Arabidopsis thaliana*. Более того, обнаружено, что CYP51 (стероид 14-деметилаза) распространен среди животных, растений, грибов, дрожжей и является гомологичным гену CYP54, наблюдающемуся у *Neurospora*. Очевидно, гены цитохрома P450 от бактерий до человека имеют общего предшественника.

Следует отметить, что в такой филогенетической расстановке генов цитохрома P450 не найдено места гену, кодирующему аналогичный фермент (CYP101), находящийся в *Pseudomonas putida*. Этот фермент выделен в кристаллическом виде и благодаря этому установлены каталитические свойства цитохрома P450.

В данную схему также не включена NO-синтаза. По своей сути этот фермент напоминает цитохром P450, то есть обладает аналогичной активностью. Тем не менее компьютерный анализ его аминокислотной последовательности показал, что он не является членом суперсемейства цитохрома P450. Показано, что С-концевой домен NO-синтазы гомологичен семейству NADPH цитохром с редуктазы. Возможно, в процессе эволюции происходил и такой тип дивергенции белков, а отсюда и их функций.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что принципиальные черты структуры и функций цитохрома P450 не претерпели существенных изменений за время дивергенции бактерий, растений и животных, которая происходила более 2 млрд. лет назад. В связи с этим одна из критических стадий эволюции — возникновение эффективного аэробного метаболизма, — почти наверняка имела место на ранних этапах развития. В это же время, очевидно, возникли и митохондрии, выполняющие важные функции клеток.

Наличие у определенного вида организмов своего набора хромосом делает актуальной задачу изучения локализации генов, кодирующих тот или иной белок (фермент). В этом плане

имеются значительные успехи, касающиеся цитохромов P450. Доказано, что CYP1A1 и CYP1A2 находятся близко друг от друга в хромосоме 15 человека. В случае, когда два или более гена находятся в кластере, рекомендовано указывать только принадлежность к семейству, т. е. «CYP1A кластер». У мышей Cyp1a1 и Cyp1a2 локализованы в хромосоме 9 и также соответствуют Cyp1a кластеру. Для указания места локализации гена в хромосоме используется известная в молекулярной биологии и генетике аббревиатура: CYP1A 15q22-qter (MRI); CYP1a Mid (Mpi1). Установлены пять функциональных генов у CYP2D и аналогичное количество CYP2D (15-я хромосома). Кластер CYP2D (22q13,1) человека представлен одним геном и двумя псевдогенами [145].

Предполагается, что 5 генов крысы, образующих CYP2D кластер, возникли в результате дупликации единичного гена, т. е. увеличения общего количества ДНК в геноме, происходившей в течение 400 млн. лет [140]. После такой дупликации диплоидные клетки имеют уже не 2, а 4 гена для каждого белка. В последующих генерациях каждая пара генов может изменяться независимо. В то время как одна пара генов продолжает направлять синтез исходного функционального белка, другая пара может претерпевать относительно большие мутационные изменения и становиться ответственной за синтез белка с той же функцией, но отличающегося по специфичности или активности.

В классических генетических исследованиях было показано, что часть одной хромосомы может быть перенесена (транслоцирована) в другую хромосому. Очевидно, что аналогичные транслокации происходили и в ходе эволюции при дупликации генов цитохрома P450. В результате таких процессов близкие гены оказались локализованными в различных хромосомах. Примером такой транслокации могут быть гены человека CYP2B (19g13,1—13,2), CYP2C (19g12—13,2) и CYP2D (10g24,1—24,3), образующие одно семейство. Наиболее древний ген CYP51 представлен соответствующим кластером у человека CYP51 (7-я хромосома) и двумя псевдогенами CYP51P1 (3-я хромосома) и CYP51P2 (13-я хромосома).

В токсикологических и фармакологических исследованиях в качестве экспериментальных животных наиболее часто используют различные линии крыс и мышей. Для них установлен изоформный состав цитохрома P450, основные представители которых представлены в табл. 8.3. Из нее следует, что только 3 изоформы семейства 1 (1A1, 1A2 и 1B1) и одна изоформа семейства 2 (2E1) представлены ортологосными формами у человека и грызунов. Это означает, что названные изоформы локализованы во всех трех видах млекопитающих. Однако и для них характерна видовая специфичность. Так, CYP4501B1 человека эффективно катализирует О-деэтилирование этоксирезорфуина, в то время как аналогичная изоформа мышей абсолютно неактивна в этих реакциях. Отмечены значительные различия между CYP4501A2 человека, с одной стороны, мышинными и крысинными, с другой, по отношению к варфаринмонооксигеназной активности [20]. Очевидно, такая видовая специфичность ортологосных изоформ объясняется различием в их аминокислотном составе (табл. 8.3).

Таблица 8.3

Основные изоформы цитохрома P450, катализирующие окисление ксенобиотиков в организме человека, крысы и мыши

CYP450	Человек	Крыса	Мышь
1A	1 (100), 2 (100)	1, (79), 2 (75)	1 (80), 2 (73)
1B	1	1	1
2A	6, 7, 13	1, 2, 3	4, 5, 12
2B	6	1, 2, 3, 12, 15	9, 10, 13
2C	8, 9, 18, 19	6, 7, 11, 12, 13, 22, 23, 24	29
2D	6, 18	1, 2, 3, 4, 5	9, 10, 11, 12, 13
2E	1 (100)	1 (80)	1 (77)
2F	1	—	2
2G	—	1	—
2J	2	3	—
3A	4, 5, 7	1, 2, 9, 18, 23	11, 13, 16

Примечание: в скобках — процент аминокислотного подобия изоформ CYP450, кодирующихся ортологосными генами

8.1.1.1.2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОФОРМ ЦИТОХРОМА P450, КАТАЛИЗИРУЮЩИХ МЕТАБОЛИЗМ ЛЕКАРСТВ

Среди многообразия CYP (табл. 8.2, 8.3) основной вклад в общее метаболическое окисление этими ферментами лекарственных средств вносят: 1A2, 2A6, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 и 3A4 (табл. 8.4).

Таблица 8.4

Содержание изоферментов P450 в печени человека
и их вклад в окисление лекарственных препаратов [139]

Изофермент	Содержание в печени, %	Вклад в окисление лекарств, %
CYP1A2	13	8,2
CYP2A6	4	2,5
CYP2B6	< 1	3,4
CYP2C9	18	15,6
CYP2C19	1	8,3
CYP2D6	2,5	18,8
CYP2E1	7	4,1
CYP3A4	28	34,1

Цитохром 1A2 локализуется, в основном, в печени. Однако он отсутствует в микросомах печени новорожденных и экспрессируется к 1—3 месяцам жизни. Уже к первому году жизни его количество составляет половину взрослого. В отличие от CYP1A1 эта изоформа окисляет не только ПАУ, но и значительное количество лекарственных средств (табл. 8.5).

Большинство препаратов, представленных в таблице 8.5, являются субстратами и других изоформ CYP. В качестве маркерных субстратов для фенотипирования CYP1A2 используются фенацетин, антипирин и кофеин. Фенацетин в процессе

Таблица 8.5

Субстраты, индукторы и ингибиторы цитохрома 1A2 [80]

Субстраты			
Амитриптилин	Имипрамин	Оланзапин	Такрин
Ацетаминофен	Клозапин	Ондансетрон	Тамоксифен
Верапамил	Кломипрамин	Пропафенон	Теofilлин
Галоперидол	Кофеин	Пропранолол	Фенацетин
Дезипрамин	Мексилетин	Ретиноиды	Флувоксамин
Диазепам	Метадон	Рилузол	Циклобензаприн
Зилеутон	Миртазапин	Ритонавир	Экстрадиол
Золмитриптан	Напроксен	Ропирвакаин	R-варфарин
Индукторы			
Инсулин	Никотин	Примидон	Фенитоин
Метилхолантрен	Омепразол	Ритонавир	Фенобарбитал
Нафциклин	ПАУ	Рифампин	
Ингибиторы			
Анастрозол	Метоксален	Тиклопидин	Циметидин
Дилтиазем	Мибефрадил	Флувоксамин	Ципрофлоксацин
Интерферон	Норфлоксацин	Фторхинолоны	Эноксацин
Кларитромицин	Ритонавир	Фурациллин	Эритромицин
Мексилетин	Такрин		

гидроксирования превращается в деметилфенацетин, антипирин в 4-оксиантипирин и кофеин в параксантин.

Еще одна особенность CYP1A2 заключается в том, что он катализирует процессы окисления ароматических аминов и ариламидов-реакций характерных только для этой изоформы фермента [147].

Оценка клиренса кофеина является важным диагностическим тестом определения функционального состояния печени при ее выраженном поражении. В силу того, что главным метаболизирующим ферментом кофеина является CYP1A2, по сути в этом тесте определяется активность этого фермента.

Как и другие цитохромы семейства 1 CYP1A2 индуцируется ПАУ, а также некоторыми лекарственными препаратами (табл. 8.5) и пищевыми продуктами (брюссельская капуста, сильно прожаренное мясо). Совместное применение субстратов CYP1A2 с его индукторами приводит к увеличению скорости окисления первых, следствием чего является снижение их терапевтической эффективности. Совместное применение субстратов CYP1A2 с его ингибиторами (табл. 8.5) угнетает метаболизм субстратов, следствием этого процесса может быть возникновение побочных эффектов. Например, не рекомендуется применять вместе ципрофлоксацин (ингибитор) и теофиллин (субстрат), так как при этом концентрация теофиллина в крови повышается в 4—5 раз, что приводит к резкому усилению кардиотоксичности [80].

Общим свойством цитохромов подсемейства 2A, среди которых CYP2A6 играет наиболее важную роль в метаболизме лекарств, является их способность индуцироваться фенобарбиталом. Цитохром 2A6 экспрессируется, в основном, в печени. Не обнаружено существенных различий в его активностях в печени новорожденных, фетальной печени и печени взрослых. Окисляет фермент небольшое число лекарственных средств: кумарин, циклофосфамид, превращение никотина в котинин [148]. Наряду с цитохромами 1A1, 1A2, 2D6 и 2E1 CYP2A6 принимает участие в биоактивации компонентов табачного дыма (нитрозаминов), вызывающих рак легких. Вместе с цитохромами 1A1, 1A2, 3A4 и 2B6 CYP2A6 катализирует процессы биоактивации афлотоксина В.

Практически существует только один ингибитор CYP2A6 — ритонавир.

Цитохром 2B6 также находится, в основном, в печени. Это была первая изоформа гемопротейна, изолированного из организма млекопитающих. Он участвует в метаболизме небольшого числа лекарственных средств (циклофосфамид, тамоксифен). Маркерным субстратом для фермента является S-метениотин, который в организме подвергается деметилированию

с образованием продукта реакции — деметилмефенитоина. Цитохром 2В6 принимает участие в метаболизме стероидов (тестостерона). В основном же, он катализирует реакции окисления ксенобиотиков (бензпирен, фенантрен, метоксифлуран, 6-аминохризен).

Типичными индукторами СУР2В6 являются фенобарбитал и другие барбитураты [149], а ингибитором — орфенандрин [80].

Подсемейство цитохромов 2С составляет более 18 % всех СУРв печени. Оно также называется мефенитоин-4-гидроксилазой, так как мефенитоин является маркерным субстратом этого подсемейства ферментов.

Цитохром 2С9 отсутствует в фетальной печени и начинает определяться только через месяц после рождения и его активность не меняется на протяжении всей жизни. Он катализирует реакции окисления многих лекарственных препаратов, в том числе и нестероидных противовоспалительных средств (табл. 8.6).

Таблица 8.6

Субстраты и ингибиторы СУР2С9 [80, 150]

Субстраты			
Гексобарбитал	Зафирлукаст	Мефенамовая кислота	Толбутамид
Глимепирид	Ибупрофен	S-Варфарин	Торсемид
Дапсон	Индометацин	Омепразол	Фенитоин
Диклофенак	Карведилол	Ритонавир	
Дронабинол	Лозартан	Сульфаметоксазол	
Ингибиторы			
Амиодарон	Кетопрофен	Сульфинпиразон	Флубипрофен
Анастрозол	Котримоксазол	Сульфонамид	Флувастатин
Диклофенак	Метронидазол	Троглитазон	Флувоксамин
Дисульфирам	Ритонавир	Фенилбутазон	Флуконозол
Зафирлукаст	Сульфафеназол	Циметидин	

Индуктором CYP2C9 является рифампицин [151], а специфическим ингибитором — сульфафеназол, ингибирующий окисление субстратов в очень низких концентрациях [150]. Совместное применение лекарств-субстратов CYP2C9 и его ингибиторов приводит к усилению или возникновению побочных эффектов. Так одновременное использование варфарина и сульфаниламидных препаратов приводит к увеличению антикоагулянтного действия.

Цитохром 2C19 катализирует процессы окисления различных по строению и терапевтическому действию лекарственных средств (диазепам, гексобарбитал, имипрамин, мефенотин, омепразол, пропранолол, ритонавир). Этот фермент принимает участие также в метаболических превращениях противомаларийных препаратов, в частности, прогуанила. Он был предложен [152] в качестве маркерного субстрата CYP2C19, вместо мефитоинового теста. В некоторых случаях для фенотипирования используют и омепразол. Индукторами фермента являются барбитураты и рифампицин, а ингибиторами — омепразол, ритонавир, толбутамид, троглитазон, фелбамат.

Среди минорных ферментов подсемейства цитохромов 2C, вносящих некоторый вклад в окисление лекарств следует отметить CYP2C8. Метаболизирует фермент диазепам, диклофенак, мефобарбитал, толбутамид. Индуцируют фермент фенобарбитал и примидон, а ингибируют омепразол.

Цитохром 2C18 катализирует реакции окисления пироксикама, напроксена, пропранолола, омепразола. Ингибирует фермент циметидин.

Цитохром 2D6 начинает определяться в печени вскоре после рождения и в течение жизни его активность не меняется. В печени взрослых особей CYP2D6 составляет около 3 % всех цитохромов P450, однако метаболизирует он 20 % всех известных препаратов [153], в том числе нейролептики, антидепрессанты, β -адреноблокаторы (табл. 8.7).

Ряд лекарственных препаратов ингибируют реакции окисления, катализируемые CYP2D6 (табл. 8.7), однако селективным

Таблица 8.7

Субстраты и ингибиторы CYP2D6

Субстраты			
Алпренолол	Имипрамин	Морфин	Фенацетин
Амитриптилин	Карведилол	Нортриптилин	Фенформин
Амфетамин	Клозапин	Ондансетрон	Флекаинид
Бисопролол	Кломипрамин	Перексилин	Флувоксамин
Буфулолол	Кодеин	Пропафенон	Флуоксетин
Венлафаксин	Мапротилин	Рisperидон	Хлорпромазин
Галоперидол	Мексилетин	Спартеин	Циклобензаприн
Дебризохин	Меперидин	Тамоксифен	Энкаинид
Дезипрамин	Метадон	Тимолол	
Дексфенфлурамин	Метоксиамфетамин	Тиоридазин	
Доксепин	Метопролол	Тразодон	
Донепезид	Минаприн	Трамадол	
Ингибиторы			
Амиодарон	Мибефрадил	Серталин	Флуфеназин
Галоперидол	Пароксетин	Тиоридазин	Хинидин
Дезипрамин	Пропафенон	Флувоксамин	Циметидин
Кломипрамин	Ритонавир	Флуоксетин	

считается хинидин [154]. Кроме дебризохина (CYP2D6 часто называют дебризохин-4-гидроксилазой) в качестве маркерного субстрата используют декстрометорфан, который в процессе О-деэтилирования образует декстрофан.

Если большинство цитохромов подсемейства 2D способны индуцироваться фенобарбиталом и клозепином, то для CYP2D6 пока не обнаружено соответствующего индуктора.

Генетический полиморфизм наиболее характерен для CYP2D6 (раздел 10.1).

Подсемейство цитохромов 2E представлено только одним, хорошо изученным изоэнзимом *CYP2E1*. Количество этого фермента резко повышается в течение первых часов после

рождения вне зависимости от гестационного возраста. К субстратам CYP2E относятся небольшое число лекарств (галотан, дапсон, изониазид, кофеин, ритонавир, теофиллин, энфлуран), а также ксенобиотики незначительной молекулярной массы (ацетон, бензол, этанол, тетрахлорметан, анилин). Эндогенными субстратами являются жирные кислоты (лауриновая кислота).

Цитохром 2E1 значительно активнее, чем изоформы других посемейств катализирует образование свободных радикалов. Например, в микросомах печени и в реконструированных системах этот фермент окисляет этанол, пропанол и бутанол до соответствующих радикалов [155]. Он проявляет необычно высокую оксидазную активность, образуя активные формы кислорода, инициируя зависимое от тетрахлорметана и НАДФН перекисное окисление липидов.

Типичными индукторами CYP2E1 являются спирты, ацетон, пиридин. Даже однократное введение крысам или мышам ацетона вызывает быстрый (в течение 6 часов) подъем концентрации белка без существенных изменений в уровне мРНК CYP2E1. Молекулярный механизм такой индукции все еще остается невыясненным. Известно только, что индуцированный ацетоном цитохром печени мышей и хомяков имеет молекулярную массу 52—22 кД и за аминокислотной последовательностью проявляет высокую гомологию к CYP2E печени крыс [156].

Реакция 6-гидроксилирования хлорзоксазона одна из немногих маркерных реакций, которая используется для оценки активности CYP2E1 у людей. Несмотря на то, что эта изоформа фермента, не единственная участвующая в реакциях окисления хлорзоксазона, все же на ее долю приходится 68 % образования 6-гидроксилхлорзоксазона [157].

К селективным ингибиторам CYP2E1 относятся диэтилдитиокарбамат, дисульфам, диметилсульфоксид, хлорметиазол, оксид азота.

Несмотря на существования значительных индивидуальных различий в активностях CYP2E1 у людей, они однако, не связаны с полиморфизмом гена этого фермента.

Цитохромы подсемейства 3А составляют 30 % всех цитохромов печени и 70 % всех цитохромов желудочно-кишечного тракта (раздел 6.5). *Цитохром 3А4* локализован преимущественно в печени и желудочно-кишечном тракте. Он не обнаруживается в фетальной печени, а экспрессируется только к первому месяцу жизни и составляет 30—40 % активности взрослой особи. Эта изоформа окисляет около 60 % всех известных лекарственных препаратов (табл. 8.8).

Таблица 8.8

Субстраты, индукторы и ингибиторы CYP3A4

Субстраты			
Азитромицин	Циклобензаприн	Кетоконазол	Такролимус
Алпразолам	Циклофосфамид	Лансопразол	Тамоксифен
Алфентанил	Циклоспорин	Лозартан	Темазепам
Амитриптилин		Мибефрадил	Терфенадин
Амлодипин	Этопозид	Миконазол	Тестостерон
Астемизол	Фелодипин	Паклитаксел	Триазолам
Аторвастатин	Фентанил	Правастатин	Верапамид
Буспирон	Фексофенадин	Преднизон	Винбластин
Бусульфан	Ифосамид	Хинидин	Винкристин
Дапсон	Имипрамид	Хинин	R-варфарин
Дексаметазон	Индинавир	Ритонавир	Зилеутон
Декстрометорфан	Исрадипин	Рифампин	Кларитромицин
Каннабиноиды	Циклоспорин А	Саквинавир	Эритромицин
Карбамазепин	Нелфинавир	Серталин	Нитрендипин
Цизаприд	Финастерид	Дилтиазем	Церивастатин
Клиндямицин	Таксол	Нифедипин	Ловастатин
Кломипрамин	Залеплон	Нисолдипин	Метадон
Клоназепам	Прогестерон	Галоперидол	Одансестрон
Кокаин	Сальметерол	Лидокаин	Эстрадиол
Хлорфенирамин	Силденафил	Мидазолам	Диазепам

Индукторы			
Карбамазепин	Фенобарбитал	Примидон	Сульфипиразон
Дексаметазон	Фенилбутазон	Рифабутин	
Глюкокортикоиды	Фенитоин	Рифампин	
Ингибиторы			
Анастрозол	Флуконазол	Миконазол	Хинидин
Циметидин	Флуоксетин	Нефазодон	Ранитидин
Кларитромицин	Флувоксамин	Нелфинавир	Ритонавир
Клотримазол	Сок грейпфрута	Невирапин	Саквинавир
Даназол	Индинавир	Норфлуоксетин	Сертиндол
Делавирдин	Интракназол	Омепразол	Троглитазон
Дилтиазем	Кетоконазол	Пароксетин	Тролеандомицин
Эритромицин	Метронидазол	Пропоксифен	Зафирлукаст
Зилеутон	Азитромицин	Ципрофлоксацин	
Гестоден	Мибефрадил	Зафирлукаст	

Наряду с изоферментами 1A1, 1A2, 2A6 и 2B6 цитохром 3A4 участвует в биоактивации афлатоксина В. Среди эндогенных веществ его субстратами могут быть тестостерон, кортизол, прогестерон [147].

Маркерными субстратами для определения активности CYP3A4 являются лидокаин, дапсон, эритромицин, нифедепин, кортизол. Однако лидокаиновый тест — наиболее чувствительный и специфический, который характеризует функциональное состояние печени при острых и хронических заболеваниях, а также при синдроме системного воспалительного ответа [80].

В литературе имеются данные о внутривидовой вариабельности окисления лекарственных средств CYP3A4. Однако молекулярного подтверждения генетического полиморфизма фермента нет.

Цитохром 3A4 относится к весьма индуцибельным ферментам и его индукторами могут быть разнообразные лекарственные

средства, в том числе и глюкокортикостероиды (табл. 8.8). Индукция CYP3A4 осуществляется через ядерный рецептор («прегнан-х-рецептор», Р-х-R). Индуктор проникает в ядро клетки, соединяется с Р-х-R, образуя соответствующий комплекс. Вследствие он связывается со специфическим участком гена CYP3A4, вызывая экспрессию [158].

Среди ингибиторов CYP3A4 особое место занимают макролидные антибиотики. Их разделяют на три группы в зависимости от способности ингибировать реакции окисления, катализируемые CYP3A4 [159]: 1) сильные (эритромицин и тролеандомицин); 2) умеренные (кларитромицин); 3) малоактивные (диритромицин, азитромицин).

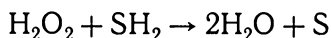
В настоящее время появились данные [160], свидетельствующие о том, что часть лекарственных препаратов традиционно рассматривающихся как субстраты CYP3A4 также окисляются CYP3A5. Следует отметить, что индукторы и ингибиторы для обеих изоформ также одинаковы. Однако для CYP3A5 идентифицированы мутации гена, ответственные за низкую каталитическую активность.

Фармакогенетические аспекты большинства изоформ CYP450 рассмотрены в разделе 10.1.1.

8.1.1.2. ПЕРОКСИДАЗЫ

Перекись водорода, образующаяся в процессе двухэлектронного восстановления кислорода или более сложным путем, например, при дисмутации супероксид-анионов разрушается пероксидазами и каталазами.

Пероксидазы катализируют двухэлектронное восстановление H_2O_2 до H_2O , используя в качестве донора электронов различные восстановители:



Пероксидазы широко распространены в растительных тканях, где они находятся в пероксисомах. В животных организма фермент содержится в слюне, печени, почках, лейкоцитах и других органах и тканях. Несколько изоформ пероксидаз (лактопероксидаза, миелопероксидаза лейкоцитов, цитохром-С-пероксидаза дрожжей, пероксидаза хрена) выделены в кристаллической форме. Все перечисленные пероксидазы активируют H_2O_2 и ROOH , а также имеют много общего в их свойствах, так как в качестве простетической группы содержат железопорфирин. В отличие от цитохрома Р450 пятым лигандом иона железа является гистидин, а шестое координационное место могут занимать различные лиганды (H_2O , CN и др.). По-видимому, обмен лигандов в шестом положении имеет существенное значение для функционирования пероксидаз.

Максимум поглощения фермента в окисленной форме составляет 420 и 541 нм, а в восстановленной — 432, 535 и 565 нм. Пероксидаза в своей структуре содержит высокоспиновое железо (Fe^{3+}) и по своим свойствам напоминает мет-гемоглобин (раздел 8.1.3). При восстановлении (Fe^{2+}) фермента возможно необратимое присоединение кислорода (оксипероксидаза).

Механизм действия пероксидаз еще во многом неясен. При его изучении особенно большое внимание уделяется различным окислительно-восстановительным состояниям фермента, которых может быть не менее пяти: Fe^{2+} , Fe^{3+} , комплексы I—III [161, 162].

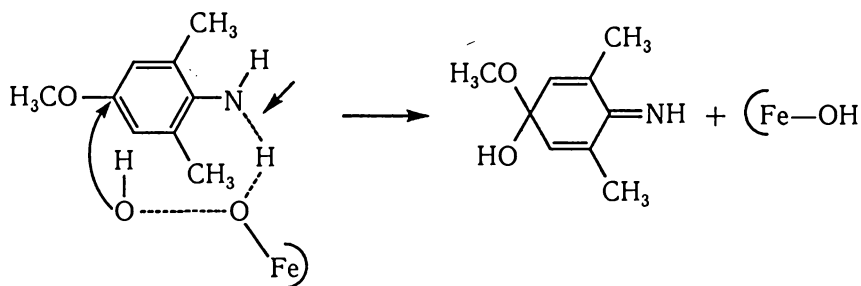
Не вдаваясь в подробности электронной структуры комплекса I, которая детально рассмотрена в работах [161] отметим, что он содержит два окислительных эквивалента. Один из них локализован на ионе железа, а другой — на порфириновом кольце гемопротейна.

Комплекс I неустойчив и легко превращается в соединение красного цвета с максимумом поглощения при 417, 530 и 561 нм. Это так называемый комплекс II. Титрование показывает, что комплекс I превращается в комплекс II одноэлектронным восстановлением.

Избыток H_2O_2 приводит к образованию комплекса III, обладающим максимумом поглощения при 417, 545 и 583 нм. По своим свойствам и действию он аналогичен оксипероксидазе и по спектральным характеристикам напоминает оксимиоглобин и оксигемоглобин. Однако предполагается, что кислород в комплексе III более активирован, чем в названных гемопротеинах.

Пероксидаза катализирует незначительное число реакций окисления ксенобиотиков, в том числе и лекарственных средств. Это могут быть реакции окисления аминов, фенолов, периодирования, переалкилирования [163].

Единого механизма реакций окисления ксенобиотиков пероксидазой не существует. По-видимому, окисляющими агентами здесь выступают комплексы I и II. Предполагается, что в процессе окисления ксенобиотиков происходит образование тройного комплекса (перекись водорода—пероксидаза—субстрат):

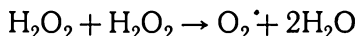


Отмечено [132], что как и в случае СУР при окислении фенилгидразина пероксидазой в качестве продукта реакции образуется фенильный радикал, алкилирующий гем (раздел 10.2).

Значительную роль в клетке играет и глутатионпероксидаза, эффективная при низких концентрациях перекиси водорода. Этот фермент также катализирует процессы с участием гидроперекисей липидов, что особенно важно в реакциях со-окисления лекарств (раздел 8.1.1.5).

8.1.1.3. КАТАЛАЗА

Для каталазы характерны два вида каталитической активности (каталазный и пероксидазный), поэтому фермент приспособлен для разложения H_2O_2 в условиях высокой и низкой стационарной концентрации перекиси водорода. Каталазная реакция фермента заключается в диспропорционировании H_2O_2 :



Реакция разложения перекиси водорода на кислород и воду с участием каталазы — высокоэффективный процесс ($k = 10^7 \text{ м}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$). Для пероксидазной реакции каталазы этот показатель составляет $10^3 \text{ м}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [163].

В настоящее время есть основания считать, что фермент катализирует не только разложение перекиси водорода, но и участвует в более сложных процессах. Например, каталаза в пероксидазных реакциях обеспечивает окисление метанола, этанола и других спиртов: $\text{R}-\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{R}-\text{CHO} + 2\text{H}_2\text{O}$. Реакция зависит от скорости образования перекиси водорода, концентраций каталазы и спирта. Субстратная специфичность каталазы отличается от алкогольдегидрогеназы. Первый фермент окисляет с возрастающими скоростями этанол, пропанол и бутанол. Второй окисляет метанол и этанол с одинаковыми скоростями. Однако его активность уменьшается, когда субстратами служат высшие спирты [165].

Косубстратами каталазы также могут быть и другие ксенобиотики (нитриты, формиат, фенолы), по-видимому, такие природные соединения, как тиреоидные гормоны и простагландины [166].

Каталаза относится к наиболее распространенным ферментам, так как содержится в различных органах и тканях экспериментальных животных. Однако наибольшее его количество сосредоточено в печени и эритроцитах. Фермент локализован в митохондриях и пероксисомах [167].

Молекулы каталаз содержат по четыре атома железа, каждый из которых хелатирован с протопорфирином IX, и кроме того связан с белком, так что структура фермента состоит из четырех субъединиц. Их разделение приводит к потере каталазной и сохранению пероксидазной функции. Порфирин в белковой глобуле находится в гидрофобном окружении. Пятым аксиальным лигандом гемового железа является одна из карбоксилатных групп, а в шестом положении может быть вода, которая легко заменяется другими лигандами [161, 163].

Молекулярные массы каталаз, полученных из различных источников составляют 22—25 кД.

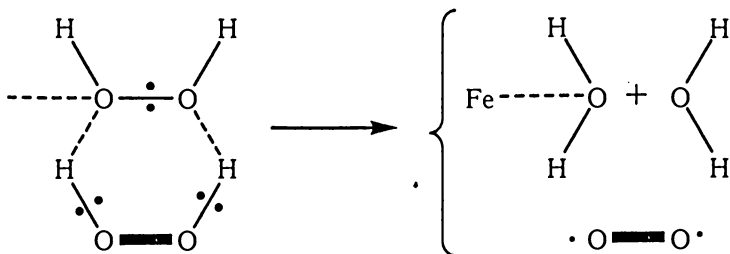
Несмотря на более чем девятидесятилетнюю историю изучения механизма действия каталазы он еще не вполне ясен.

Отметим некоторые из положений, которые являются вполне доказанными и в той или иной степени способствуют созданию теории ферментативного действия каталаз. Во-первых, разложение перекиси водорода не может быть объяснено цепными процессами, так как реакция не имеет индукционного процесса и не ингибируется антиоксидантами. Во-вторых, спектральными методами показано, что перекись водорода с каталазой образуют три типа комплексных соединений.

Комплекс I зеленого цвета (λ_{max} 405, 655 нм) обладает высокой каталитической активностью и участвует в ферментативном процессе. Он аналогичен комплексу I пероксидаз. При избытке H_2O_2 образуется комплекс II красного цвета (λ_{max} 429, 536, 568 нм), который в 10 000 раз менее активен, чем комплекс I. В случае больших концентраций перекиси водорода каталаза также может образовывать комплекс III (λ_{max} 416, 545, 585 нм).

Если активным компонентом каталазы является комплекс I, то становится понятным почему при разложении перекиси водорода на одну молекулу фермента используется две молекулы H_2O_2 . Одна из них идет на образование комплекса I, а вторая — выполняет роль субстрата. При этом соединение I выступает в роли двухвалентного окислителя, так как осуществляет перенос

двух электронов от связанной с ферментом молекулы H_2O_2 к другой ее молекуле. Конечными продуктами реакции являются вода и кислород, который ниже представлен в виде бирадикала:



В рамках представленной схемы можно объяснить и механизм окисления спиртов комплексом I. С этой целью H_2O_2 необходимо заменить на фрагмент $\text{H}-\text{C}-\text{OH}$ [161, 163]. Окисление первичных спиртов (RCH_2OH) протекает тем медленнее, чем больше размер алкильной группы R.

В заключение хотелось бы отметить, что для каталазы практически отсутствуют данные о роли аминокислотных остатков активного центра фермента в каталитическом цикле. Однако можно с уверенностью сказать, что подобно другим гемопroteинам, дистальный гистидин каталазы принимает активное участие в этом процессе.

8.1.1.4. ФЕРМЕНТНЫЕ СВОЙСТВА МИОГЛОБИНА И ГЕМОГЛОБИНА

Положение таких макромолекул как миоглобин (Мв) и гемоглобин (Нв) в обсуждаемой проблеме неоднозначно. С одной стороны, их взаимодействие с ксенобиотиками можно квалифицировать как неферментативные процессы. С другой стороны, если Нв катализирует НАДФН-зависимое окисление анилина и его производных [168], то такую реакцию можно отнести

к ферментативной. Отметим, что наблюдаемое явление не является исключением в биохимии чужеродных соединений. Например, очищенный сывороточный альбумин человека катализирует гидролитическое расщепление эфиров, включая ацетилсалициловую кислоту [169]. Скорость такой реакции не меняется при использовании ингибиторов холинэстеразы.

Следовательно все перечисленные белки, скорее всего, можно отнести к ферментомиметикам.

По своей структуре Мв и Нв относятся к гемопротеинам и выполняют главную физиологическую функцию — транспорт кислорода. Если Мв состоит из одной полипептидной цепи и гема, то Нв представлен двумя α - и двумя β -цепочками.

В отличие от СУР, у которого пятое координационное положение порфирина занято цистеином, в молекулах Мв и Нв, также как у пероксидазы и каталазы, содержится остаток гистидина. Для мутантных Нв отмечена замена гистидина на тирозин.

Если пероксидаза, каталаза и СУР450 в функционирующем состоянии содержат гемин, то Мв и Нв — гем. В отсутствие кислорода они называются дезоксигемоглобином и дезоксимоглобином, а в связанном с кислородом состоянии оксигемоглобином (HbO_2) и оксимиоглобином (MbO_2). Кислород в HbO_2 в определенных условиях может замещаться такими нейтральными лигандами как СО (карбоксигемоглобин) или NO.

Все нейтральные лиганды связываются только с гемовой частью молекулы Нв. В тоже время белковая часть обеспечивает обратимое, без окисления железа ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$), связывание кислорода. Она также способствует регулированию этого процесса и освобождению кислорода.

В некоторых случаях Мв и Нв могут превращаться в гемопротеины, содержащие железо в трехвалентном состоянии, т. е. окисляться. Окисленный Нв называют метгемоглобином (Met Нв), а нарушение — метгемоглобинемией.

Возможны, по крайней мере, три причины, обуславливающие образование Met Нв в эритроцитах:

1. Если в эритроцит попадает ксенобиотик, то в случае недостатка глутатиона (понижение скорости синтеза или нехватка глутатионпероксидазы) образуется перекись водорода, повреждающая Нв.

2. Самопроизвольное (автоокисление) Нв в процессе транспорта кислорода. Так ежедневно около 0,5 % Нв превращается в Met Нв. Предотвращает этот процесс гемоглобин-редуктаза. Аналогичную функцию выполняет система, использующая в качестве кофактора НАДФН.

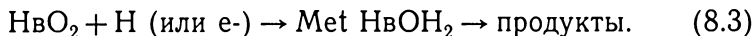
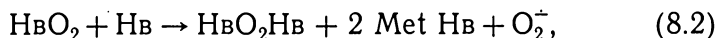
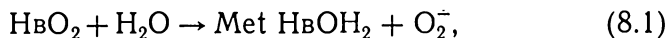
3. Врожденные аномалии Нв. Их насчитывают пять и они характеризуются тем, что у каждого из них в области гемового кармана имеется замена аминокислоты, что создает предпосылку для процесса $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$.

Метгемоглобинемия может быть обусловлена и редкой врожденной недостаточностью метгемоглобин-редуктазы. В этом случае 25—40 % всего Нв может находиться в виде Met Нв, что сопровождается цианозом.

Представленные факты отражают только некоторые физико-химические свойства и функциональное состояние Мв и Нв, но они не раскрывают сути их действия в качестве ферментов окисляющих лекарства. В настоящее время выделяют несколько типов реакций в которых Мв и Нв могут генерировать активные формы кислорода: 1) автоокисление; 2) пероксидазные реакции; 3) монооксигеназные реакции; 4) реакции соокисления. Понятно, что процессы 2—4 носят несколько условное название.

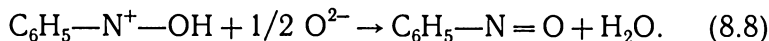
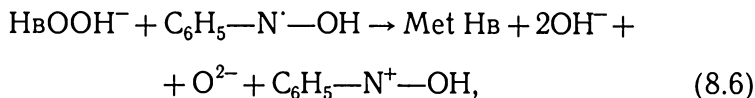
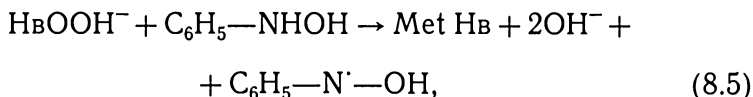
1. Способность к автоокислению имеют только MvO_2 и HvO_2 . Однако по сравнению с пероксидазами и различными изоформами СУР450 эти оксиформы гемопротеинов характеризуются в нормальных условиях большой устойчивостью [161]. Это объясняется функциональными особенностями Мв и Нв, так как главная их задача транспортировать, а не активировать O_2 .

В настоящее время предполагается [168] наличие трех возможных механизмов окисления HvO_2 :



Реакция 8.1 характерна для целого ряда железопорфиринов. Однако, только в зависимости от величины окислительно-восстановительного потенциала $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ гемопротейны способны генерировать супероксид — анион. Реакция становится главной, если этот потенциал ниже чем у Hb (E_0 при pH = 7,4 составляет +0,2 В). Как правило такое снижение достигается заменой аксиального лиганда. Реакция 8.2 маловероятна, так как белок препятствует димеризации Hb и HbO₂.

Наиболее изучена и часто встречающаяся реакция окисления HbO₂ с участием доноров атома водорода или электрона (8.3). Такими донорами могут быть органические восстановители (анилин, фенилгидразин, фенол и др.). Установлено, что HbO₂ окисляет эти вещества по радикальному механизму. Так HbO₂ с большой скоростью окисляет фенилгидроксиламин до нитробензола соответственно реакциям 8.4—8.8 [170].



Имеются также сведения [170] о том, что N-алкилфенилгидроксиламины и N-бензилфенилгидроксиламины в реакциях с HbO₂ образуют нитрены. Алифатические спирты не окисляются

в этой системе, так как значительно хуже диссоциируют чем гидразины и поэтому являются более слабыми донорами электронов.

Необходимо также подчеркнуть, что различные изоформы СУР450 в окисгинированном состоянии не способны окислять субстраты. Для проявления такой активности им необходимы *путидаредоксин* (бактерии) или *цитохром b_5* (животные).

2. Пероксидазные реакции Мв и Нв напоминают процессы, катализируемые пероксидазами и каталазами. Для различных изоформ СУР также наблюдается способность окисления лекарственных с использованием гидроперекисей, (но не H_2O_2). Следовательно, для многих железосодержащих гемопroteинов характерным является каталитическое действие в реакциях перекисного окисления ксенобиотиков. Учитывая тот факт, что механизмы окисления ксенобиотиков с участием Мв и Нв в присутствии H_2O_2 и ROOH близки, мы остановим наше внимание только на перекиси водорода.

Число реакций перекисного окисления ксенобиотиков Мв и Нв значительно: деалкилирование *N*-алкиламинов (диметиланилин, диметил-*n*-толуидин, аминопирин), ароматическое гидроксילирование (ацетанилид, *n*-толуидин, анилин и др.) [161, 171]. При взаимодействии этих гемопroteинов с H_2O_2 зарегистрированы спектры идентичные спектрам комплекса I (FeO^{3+}) ряда пероксидаз. Этот факт, а также данные ЭПР-спектроскопии комплекса, кинетические и энергетические параметры при окислении одного и того же субстрата в системах пероксидаза— H_2O_2 и Нв— H_2O_2 предполагают существование в обоих случаях исходного окисляющего агента.

При взаимодействии Нв с H_2O_2 образуется Met Нв, дающий комплекс I (Met Нв — H_2O_2). Однако, в отличие от комплекса I пероксидаз (раздел 8.1.1.2) он нестабилен и быстро превращается в комплекс II (FeO^{2-}). Комплекс II принимает электроны от восстановителей, субстратов и продуктов реакции. Так, анилин и фенол с высокой скоростью окисляются этой системой, а ацетанилид и *n*-толуидин — с низкой. Соответственно гидрохинон,

являясь более сильным восстанавливающим агентом, чем аминофенол лучше окисляется комплексом II [172, 173].

Аскорбиновая кислота и НАДН предотвращают дальнейшее окисление продуктов реакции при участии Нв. Предполагается, что эти соединения конкурируют с ксенобиотиками в качестве восстановительных агентов комплекса II.

Гидроксирование анилина осуществляется с высокой скоростью при использовании Met Нв, а не НвО₂. Для фенола наблюдается обратная картина. Объясняется такое различие типом гидроксилирующих частиц, генерирующими этими гемопroteинами [171].

3. Кровь человека, также как и эритроциты или гемолизаты человека, свиньи, кролика, барана катализируют типичную реакцию цитохром Р450-зависимых монооксигеназ (например, превращение анилина в *n*-аминофенол). Плазма крови из перечисленных источников оказалась не эффективна по отношению к этому субстрату. Для эритроцитов человека и барана отмечена линейная зависимость образования *n*-аминофенола от срока времени инкубации и концентрации Нв [174]. В этой реакции в качестве субстратов также были использованы фенол, *N*-метиланилин, *o*- и *m*-толуидин. Наибольшую активность проявляли эритроциты по отношению к *N*-метиланилину (реакция *N*-деметилирования). Что касается реакции ароматического гидроксирования, то использованные субстраты составляли следующий ряд: анилин > фенол = *m*-толуидин > *o*-толуидин. Производные анизол (*n*-нитроанизол, *n*-анизидин), являясь субстратами *O*-деметилирования, не давали продуктов реакций даже в том случае, когда в инкубационную среду вносились глюкоза и метиленовый синий. Этот факт — необычен, так как существуют данные о способности эритроцитов катализировать реакцию *O*-деметилирования *O*-метилкатехолов [175].

Известно, что даже в тетрамерном Нв взаимодействие лигандов с α - и β -субъединицами может заметно различаться. Следовательно представляет определенный интерес определить вклад каждой субъединицы Нв в гидроксирование

ксенобиотиков. Такие данные приведены в работе Миела и сотрудников [174] и представлены в таблице 8.9.

Если сложить активности α - и β -субъединиц и разделить на 2 (в таблице 8.9 они представлены в виде тетрамеров, а не димеров, как в случае Met Hb), то окажется, что цепи составляют только 1/3 часть анилингидроксилазной активности Met Hb. Значит, только в сочетании $\alpha_2^{3+}\beta_2^{3+}$ субъединицы оказывают наибольшую активность. В пользу такого заключения свидетельствуют исследования скоростей гидроксилирования анилина α -сегментом гемоглобином. В этом случае β_2^0 , т. е. такая цепь лишена гема.

В последние годы разработаны методы, позволяющие получить «валентные гибриды» из нормального Hb, содержащего в одной из цепей Fe^{3+} . Следовательно, в этих гибридах только один тип цепи (Fe^{2+}) может взаимодействовать с кислородом или окисью углерода. Таким образом, появляется возможность наблюдать влияние лиганда, связавшегося с одной цепью на другой тип субъединицы в нормальном Hb.

Сравнивая активность анилингидроксилазы α - и β -ферригб-ридов можно заметить значительное преобладание последнего (таблица 8.9). По-видимому, для проявления анилингидроксид-ной активности Hb необходима его четвертичная структура. Кроме того, наиболее чувствительной в этом плане является β -цепь гемопотеина.

Таблица 8.9

Анилингидроксилазная активность Hb и его субъединиц

№ п/п	Гемоглобин или его производные	Активность (р моль <i>n</i> -аминофенола/мин)
1	Метгемоглобин ($\alpha_2^{3+}\beta_2^{3+}$)	$74,7 \pm 2,9$
2	Альфа субъединица (α^{3+}_4)	$31,3 \pm 1,35$
3	Бета субъединица (β^{3+}_4)	$9,9 \pm 1,1$
4	α -сегмент гемоглобина ($\alpha_2^{3+}\beta_2^0$)	$20,7 \pm 3,3$
5	α -ферригбрид [$\alpha^{3+}_2(\beta^{2+}-\text{CO})_2$]	$38,1 \pm 2,6$
6	β -ферригбрид [$(\alpha^{2+}-\text{CO})_2\beta^{3+}_2$]	$75,9 \pm 2,0$

Для понимания некоторых сторон механизм действия Нв, как терминальной оксидазы в монооксигеназном катализе, были проведены исследования с использованием реконструированной системы СУР450. Принцип реконструирования ферментных систем достаточно хорошо разработан и широко применяется в биохимии.

Частично реконструированная монооксигеназная система печени крыс состоит из следующих компонентов [176]: СУР450 (1 мкм), НАДФН (1 мм), НАДФН-цитохром с редуктазы (0,05 е), фосфатидилхолин (50 мкг/мл). Для Met Нв (1 мкм) были использованы те же компоненты, исключая фосфатидилхолин. Для проявления гидроксилазной активности СУР450 необходимы липиды [132]. Для Met Нв нет такой необходимости, так как этот гемопротеин находится в растворимой форме в цитозоле клетки. В качестве субстрата в обоих случаях был использован анилин.

Оказалось, что гидроксилирование анилина в реконструированных системах проходит с одинаковой скоростью: микросомы печени крыс — 0,22; Met Нв человека — 0,20; Met Нв кашалота — 0,08 мол *n*-аминофенола/мин на 1 мол. гемопротеина. Удивительным оказался тот факт, что перечисленные выше показатели были в 10—100 раз выше, чем у нереконструированных эритроцитов. Очевидно предложенная система не в полной мере отражает сущность каталитического действия Нв в клетке.

Тем не менее участие Нв в монооксигеназном катализе возможно, так как и для СУР450 необходимо наличие O_2 , НАДФН и НАДФН-цитохром с редуктазы. Реакции окисления ксенобиотиков ингибируются окисью углерода. Отмечена также линейная зависимость между скоростями реакции гидроксилирования и концентрацией Нв.

Общие вопросы, касающиеся соокисления лекарственных средств в организме экспериментальных животных и человека и участие в этих процессах Мв и Нв будут освещены в разделе 8.1.1.5.

В заключение следует отметить, что представленные данные свидетельствуют о необычных свойствах Мв и Нв, заключающихся в генерации активных форм кислорода и способствующих окислению ряда органических веществ. Очевидно, не следует искать физиологическое объяснение этому процессу, однако учитывать его необходимо.

8.1.1.5. ФЕРМЕНТЫ, КАТАЛИЗИРУЮЩИЕ СООКИСЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Термин «соокисление» в биохимии ксенобиотиков появился относительно недавно. Этому способствовали исследования биотрансформации ксенобиотиков в семенных пузырьках барана. Известно, что в них содержится значительное количество простагландинов, образование которых катализируется простагландинсинтетазой. Однако, на некоторых этапах биосинтеза простагландинов участвуют и монооксигеназы (раздел 10.1.2), содержащие цитохром Р450 [133]. Поэтому до определенного времени считалось, что окисление ксенобиотиков в семенных пузырьках катализируется монооксигеназами.

Вместе с тем, в последнее время накопилось достаточное число экспериментальных данных, опровергающих такое представление. Их можно свести к следующим пунктам: 1) в микросомах семенных пузырьков барана цитохром Р450 отсутствует; 2) набор метаболитов ксенобиотиков в семенных пузырьках отличается от продуктов реакций, протекающих в микросомах печени животных; 3) НАДФН не оказывает влияния на скорость реакции окисления ксенобиотиков; 4) метгемоглобин ускоряет реакции окисления субстратов.

Более того, окисление ксенобиотиков в микросомах семенных пузырьков барана может осуществлять только в том случае, если в инкубационную среду вносят арахидоновую кислоту или простагландины. Следовательно, вначале происходит

окисление арахидоновой кислоты до метаболита, который может быть использован гемопротеинами в качестве источника активной формы кислорода. Как оказалось впоследствии такими метаболитами могут быть органические гидроперекиси (в каскаде арахидоновой кислоты это простагландин G_2).

Органические гидроперекиси могут образовываться в результате взаимодействия веществ с озоном и 1O_2 , а также в реакциях одноэлектронного переноса и ферментативных реакциях [177]. Среди основных групп гидроперекисей обнаруженных в живых организмах следует назвать три: 1) производные полиненасыщенных жирных кислот (линолевая, метиллинолевая, глицериллинолевая, холистеринлинолевая, линоленовая-9- OOH_2 -13- OOH , арахидоновая-5- OOH , PGG_2 , 15- OOH - PGE_1); 2) производные стероидов (холестерин-7 β - OOH и -25 β - OOH , прегненолон-17 α - OOH , прогестерон -17 α - OOH ; 3) производные нуклеиновых кислот (переоxygenенная ДНК, тимин — OOH).

Следует добавить, что при моделировании тех или иных ферментных систем, катализирующих восстановление молекулярного кислорода очень часто используют гидроперекиси этила, трет-бутила или кумила.

Гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот образуются в организме, в основном, по двум различным механизмам (автоокисление и реакцией с 1O_2). Отсюда различное соотношение продуктов перекисного окисления этих кислот (табл. 8.10).

Несмотря на свою высокую реакционную способность, гидроперекиси довольно устойчивы в среде, не содержащей ионы металлов переменной валентности. Например, 9-гидроксипероксид и 13-гидроксипероксид линоленовой кислоты стабильны при 22 °C в течение суток.

Однако, в большинстве случаев гидроперекиси в живых организмах подвергаются восстановлению и распаду [179]. В результате двухэлектронного переноса из гидроперекисей образуются соответствующие оксипроизводные. В этом случае в качестве источников водорода выступает глутатион. В общем,

Таблица 8.10

**Соотношение моногидроперекисей ненасыщенных жирных кислот
в различных реакциях их образования [178]**

Жирная кислота	Аутоокисление			Реакция с $^1\text{O}_2$		
	Положение ООН группы	Положение двойной связи	Соотно- шение изомеров (%)	Положение ООН группы	Положение двойной связи	Соотно- шение изомеров (%)
18:2 (9, 12)	9	10, 12	50	9	10, 12	53
	13	9, 11	50	13	9, 11	
				10 12	8, 12 9, 13	47
18:3 (9, 12, 15)	9	10, 12, 15	33,4	9	10, 12, 15	74
	12	9, 13, 15	10,1	10	8, 12, 15	
	13	9, 11, 15	12,5	12	9, 13, 15	
	16	9, 12, 14	43,9	13	9, 11, 15	
				15	9, 12, 16	8
				16	9, 12, 14	18

таким способом осуществляется регуляция уровней гидроперекисей в клетке. Наибольшая информация о соокислении ксенобиотиков сосредоточена в работах, посвященных простагландинсинтетазному катализу. Известны две группы первичных простагландинов — серий Е и F, отличающихся друг от друга тем, что первые содержат кетогруппу, а вторые — гидроксильную группу при С—9 цикlopentanового кольца. Каждая из серий включает по три простагладина: E_1 , E_2 , E_3 , F_{1a} , F_{2a} и F_{3a} . Остальные относятся ко вторичным, так как являются продуктами ферментативного или химического превращения первичных. Так, простагландины серии А образуются в результате дегидратации цикlopentanового кольца простагландинов Е (ПГЕ), а серии В — из простагландинов А (ПГА) путем изомеризации двойной связи кольца.

Конечные продукты биосинтеза простагландинов неодинаковы в различных органах и тканях. Следует отметить, что арахидоновая кислота превращается только в ПГЕ₂ и ПГФ_{2 β} , эйкозатриеновая кислота — в ПГЕ₁ и ПГФ_{1 α} , а эйкозапентаеновая — в ПГЕ₃ и ПГФ_{3 α} .

Биосинтез ПГЕ₂ и ПГФ_{2 α} катализируется простагландинсинтетазой [180]. Это мультиферментный комплекс, состоящий из циклооксигеназы, пероксидазы, редуктазы и изомеразы. В зависимости от органа и ткани простагландинсинтетаза может катализировать образование простациклина (ПГГ₂) из которого не ферментативным путем синтезируется 6-оксо-ПГФ_{1 α} , простагландин D₂, а также тромбоксан A₂, мгновенно превращающийся в тромбоксан B₂.

При изучении молекулярной организации некоторых ферментов простагландинсинтетазы было показано, что для проявления активности, например пероксидазы и циклооксигеназы необходим гем. При этом циклооксигеназная активность ($20:4 + 2O_2 \rightarrow \text{ПГГ}_2$) всегда ниже пероксидазной ($\text{ПГГ}_2 + \text{АН}_2 \rightarrow \text{РПН}_2 + \text{А} + \text{Н}_2\text{О}$). Рассматривая обе реакции, некоторые авторы [183] считают, что *in vivo* ПГГ₂ не является свободным метаболитом, а остается связанным с ферментом в процессе всего каталитического цикла.

Активный фермент относится к мембранносвязанным, является гемогликопротеином с единственной полипептидной цепью и молекулярной массой 72 кД [181]. При инкубации фермента с ацетилсалициловой кислотой (аспирин) наблюдается потеря только циклооксигеназной активности. В этом случае ацетильный участок аспирина присоединяется к активному центру фермента, инактивируя его (рис. 8.2).

При расщеплении такого ацилированного комплекса проназой рН 8,3 в течение 16 час, при температуре 35 °С образуется N-ацетилсерин (III). Если же протеолиз вести при более низких значениях рН, с коротким периодом воздействия температуры то освобождается О-ацетилсерин (II). Об этом свидетельствует появление в этих условиях и N-фенилананин-О-ацетилсерина (IV).

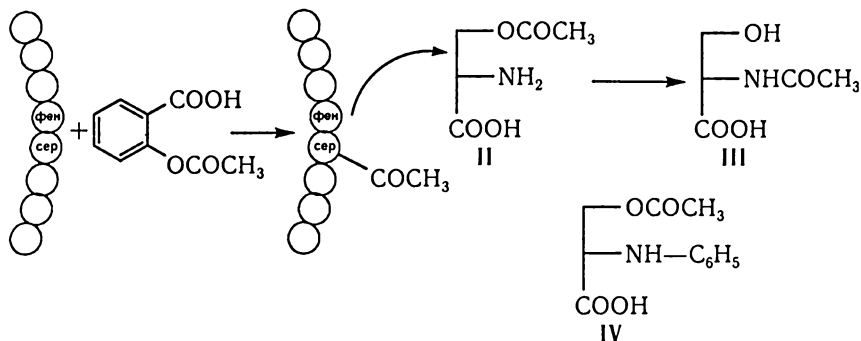


Рис. 8.2. Ацетилирование циклооксигеназы аспирином

Определение аминокислотной последовательности одиннадцати аминокислот N-концевой части полипептида фермента свидетельствует о наличии в их составе неполярных производных (4-х остатков пролина). Гипотетическая схема расположения фермента в мембране и его частичная структура представлена на рис. 8.3 [181]. Следовательно, активный центр фермента не содержит ковалентных связей между гидроксильной группой серина и соответствующими группами гема.

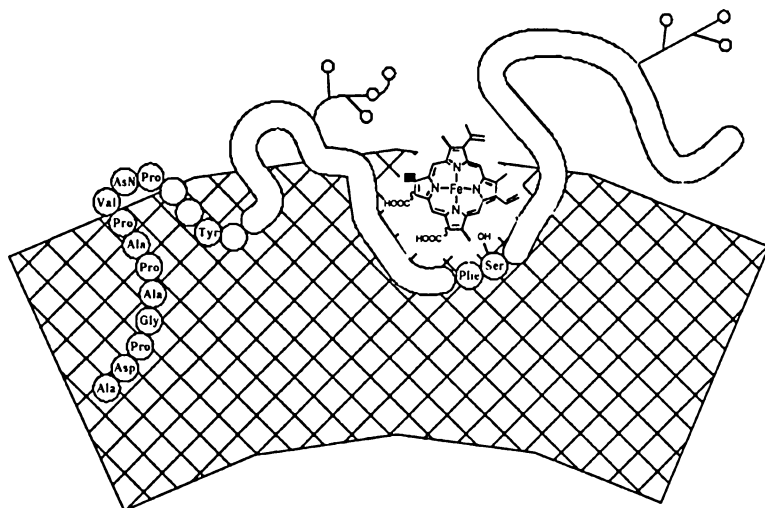


Рис. 8.3. Схематическое расположение молекулы простагландинсинтетазы в мембранах микросом семенных пузырьков барана

Механизмы соокисления ксенобиотиков в простагландинсинтезном катализе рассматриваются на примерах субстратов с различной структурой. Однако наиболее значительные успехи достигнуты в опытах, где были использованы полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) и ароматические амины. Источником простагландинсинтетазы служили семенные пузырьки барана, легкие, кишечник, тромбоциты и другие органы и ткани экспериментальных животных.

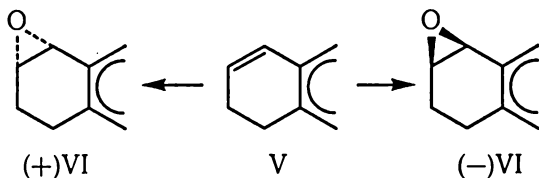
Известно, что бенз(а)пирен в гепатоцитах образует следующие группы метаболитов: 1) фенольные производные (3-окси; 6-окси; 9-окси); 2) эпоксиды (7,8-эпокси; 9,10-эпокси; 4,5-эпокси); 3) хиноны (1,6-; 3,6- и 6,12-); 4) дигидродиолы; 5) эпоксиды дигидродиолов; 6) тетролы. Метаболиты 1—3 и 5 образуются в монооксигеназном, а 4 и 6 — в эпоксидгидролазном катализе.

Физико-химическими методами анализа установлено [182], что в семенных пузырьках барана бенз(а)пирен превращается в 1,6-, 3,6- и 6,12-хиноны. Исходя из общих принципов механизмов окислительных реакций ксенобиотиков [20] можно заключить, что между бенз(а)пиреном и хинонами существуют промежуточные соединения эпоксидной природы.

Если в качестве субстрата простагландинсинтетазы используют (\pm)-*транс*-7,8-диокси-7,8-дигидробенз(а)пирен, то он в основном превращается в метаболит — *анти**транс*-бенз(а)пирен-7,10(8,9-тетрол) и в меньшей степени — в другие три диола.

Выход метаболитов увеличивается при внесении в инкубационную среду арахидоновой кислоты, ПГГ₂ и Δ -оксиперокси-5,8,11,13-эйкозатетраеновой кислоты [182]. Метирапон и СО не ингибируют как в случае цитохрома Р450 эти процессы, а НАДФН не ускоряет их. В тоже время индометацин (ингибитор простагландинсинтетазы) замедляет реакцию на 50 % [183]. Аналогичное соокисление бенз(а)пирена осуществляется также в легких морских свинок и толстой кишке [184].

Не вдаваясь в подробности методических приемов, использованных рядом авторов для выяснения источника активной формы кислорода, внедряемого в субстраты, отметим, что ими



Простагландинсинтетаза микросом семенных пузырьков барана окисляет V. с выходом продуктов реакции (—)-VI. и (+)-VI. в соотношении 54:46. Для монооксигеназной реакции оно составляет 89:11 (интактные микросомы крыс), 62:38 (индуцированные фенобарбиталом) и 69:31 (индуцированные 3-метилхолантроном).

Представленные результаты свидетельствуют о том, что для реакции эпексидирования характерно избирательное (частичное) образование из субстрата продукта, содержащего центр асимметрии. Это один из четырех возможных случаев стереохимической специфичности действия ферментов при метаболизме ксенобиотиков. В данном случае для простагландинсинтетазы отсутствует стереохимическая специфичность действия.

Парацетамол (ацетаминифен) в организме человека и подопытных животных образует сульфат и глюкуронид. Значительная часть этого препарата окисляется монооксигеназами с образованием N-оксипарацетамола, который, будучи нестабильным промежуточным соединением, превращается в химически реакционноспособный имидохинон. Если в среде содержится эквивалентное количество глутатиона, имидохинон превращается в нетоксичный метаболит. В опытах на животных он обнаруживается в моче в виде производных меркаптуровой кислоты.

Микросомы семенных пузырьков барана и мозгового слоя почек кролика в присутствии арахидоновой кислоты катализируют соокисление парацетамола до электрофильного метаболита, который также образует конъюгат с восстановленным глутатионом [186]. В атмосфере азота скорость образования такого конъюгата снижалась на 80 %. Индометацин и антиоксиданты блокируют эту реакцию, а метирапон не оказывает

на нее существенного влияния. Образование конъюгата — ферментативный процесс, поскольку он зависит от концентрации микросомного белка в пробе.

Гидроперекись линолевой кислоты также способна инициировать метаболизм парацетамола. Однако скорость соокисления субстрата значительно ниже, чем в случае использования арахидоновой кислоты. Ингибирующий эффект в этом случае оказывают только антиоксиданты.

В отличие от цитохром Р450-зависимых ферментов простагландинсинтетаза в качестве интермедиата не образует N-гидроксильного производного парацетамола. По-видимому, при этом каталитическом процессе образуются соответствующие радикалы, которые при взаимодействии с глутатионом превращаются в меркаптуровые кислоты.

В биохимии чужеродных веществ для установления механизмов окислительных реакций, молекулярной организации и свойств ферментных систем, катализирующих эти процессы, в качестве субстратов используют N-, O- и S-монометил-, и диметилпроизводные. Моноксигеназы осуществляют N-деметилирование этих субстратов с образованием в качестве промежуточного соединения карбиноламина. Конечными метаболитами этой реакции являются формальдегид и соответствующие N-деалкильные производные. Стехиометрия процессов позволяет регистрировать по образованию формальдегида активность ряда моноксигеназ.

Микросомы семенников барана в присутствии арахидоновой кислоты также окисляют производные монометил- и диметиланилина. Индометацин ингибирует эти процессы. Установлено [187], что деметилирование названных субстратов простагландинсинтетазой происходит в аэробных условиях и в отличие от моноксигеназ не характеризуется строгой субстратной специфичностью. Формальдегид образуется в инкубационной среде через 10—20 с после внесения субстрата, и процесс, как правило, продолжается 4—5 мин. Оптимальная концентрация белка микросом в пробе составляет 1 мг.

Инициировать деметилирование веществ могут также 15-пероксиарахидоновая кислота, трет-гидроперекись бутила и перекись водорода, но ПГН₂ и НАДФН в этом случае в инкубационной среде не требовалось. Аналогичные процессы обнаружены в легких морских свинок и мышей, а также в мозговом слое почек кролика.

Механизм N-деметилирования субстратов простагландинсинтетазой отличается от монооксигеназного. Однако он окончательно не выяснен. Предполагается, что промежуточным продуктом при таком процессе может быть катион-радикал, который после гидролиза превращается в формальдегид.

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что во всех перечисленных реакциях соокисления простагландинсинтетаза выступает в роли простагландинпероксидазы. Следовательно, этот фермент по своим каталитическим свойствам должен напоминать другие пероксидазы. В биохимии хорошо известны механизмы действия пероксидаз на некоторые амины и фенолы.

Для простагландинсинтетазы характерным является и соокисление эндогенных субстратов: стероидов [188] и билирубина [189].

8.1.1.6. ГЕМОКСИГЕНАЗА

По крайней мере три причины обусловили включение этого фермента в общий круг обсуждаемой проблемы. Во-первых, большая часть ферментных систем, обеспечивающих каталитическое окисление лекарственных средств относятся к гемопротеинам. Во-вторых, механизм действия гемоксигеназы напоминает цитохром P450-зависимый катализ. Отсюда долгое время считалось, что терминальной оксидазой гемоксигеназы является CYP450. В третьих, синтетические порфирины определенной структуры могут служить субстратами гемоксигеназы.

Кроме того, наряду с аминолевулинатсинтетазой гемоксигеназа относится к регуляторным ферментам биосинтеза и распада гемопротеинов, что обеспечивает физиологическую активность последних [190].

Распад гема в клетке катализируется гемоксигеназой с образованием СО, Fe и биливердина. При этом фермент специфически расщепляет α -метеновый мостик гема до СО, и два атома кислорода включаются в тетрапиррол — биливердин.

Наилучшим субстратом гемоксигеназы является метгем (протогемин IX), связанный с альбумином (метгемальбумин), однако метгемоглобин, гемоглобин—гаптоглобиновый и гемоглобин—гемопексиновый комплексы также могут служить субстратами. Оксигемоглобин, карбоксигемоглобин и миоглобин не атакуются ферментом. Собственно субстратом является хелатный комплекс с металлом; свободные порфирины не атакуются. Источником основной части биливердина, образующегося в ретикулоэндотелиальной системе, является гем гемоглобина, однако другие гемопротеины, такие, как СУР450, триптофанпирролаза, цитохром b_5 и каталаза, период полупревращения которых составляет от 2 до 50 ч, также атакуются гемоксигеназой, т. е. их гем вносит свой вклад в образование пула биливердина. Такие металлы как кобальт, не только индуцируют гемоксигеназную активность, но и повышают скорость деградации СУР450, содержание которого в клетке выше, чем других гемопротеинов [191—193].

Для каталитического действия гемоксигеназа нуждается в НАДФН-цитохром с *редуктазе*, НАДФН и молекулярном кислороде. Неудивительно, что вначале исследований фермента считалось [194], что СУР450 является его терминальной оксидазой. Однако детальное изучение молекулярной организации и каталитических свойств гемоксигеназы показало [195] отсутствие СУР450 в ее каталитическом акте. Скорее всего, действие гемоксигеназы напоминает процесс окисления миоглобина и гемоглобина аскорбиновой кислотой с образованием в качестве конечных продуктов реакции зеленых пигментов и биливердина.

Несмотря на способность гемоксигеназы связывать гем с образованием комплекса в соотношении 1:1 этот фермент нельзя отнести к гемопротеинам. Тем не менее, спектральные характеристики такого комплекса весьма интересны. Если с гемоксигеназой связывается гем (Fe^{3+}), то он напоминает метгемоглобин. При восстановлении комплекса возможно его взаимодействие с СО с возникновением спектров поглощения, напоминающих соответствующие формы миоглобина и гемоглобина. Оксигенированные формы комплекса имеют максимум поглощения при 412, 540 и 575 нм, т. е. имеют близкие показатели к оксигемоглобину.

Предположено [196], что гем в полипептидной цепи гемоксигеназы имеет аналогичное аминокислотное окружение, как и в миоглобине и гемоглобине. Однако координационные связи между гемом и аминокислотами фермента очень быстро разрушаются если комплекс инкубировать с НАДФН-цитохром *c* редуктазой. С меньшей скоростью аналогичный процесс протекает при внесении в инкубационную среду аскорбиновой кислоты.

В процессе окисления гема гемоксигеназа использует три атома кислорода. Два из них внедряются в молекулу биливердина и один в СО. Все они имеют своим предшественником O_2 , а не H_2O [190]. Оптимум рН фермента 7,4—7,5 и K_m (субстрат гемин) — 5 мкм. Активности экстрактов различных органов и тканей экспериментальных животных значительно отличаются. Например, у крыс они составляют: селезенка — 0,79; печень и мозг — 0,07; почки — 0,03; легкие — 0,02 нмол биливердина или билирубина $\cdot \text{мин}^{-1} \cdot 10 \text{ мг белка}^{-1}$ [197].

Наибольшую субстратную специфичность гемоксигеназа проявляет по отношению к протопорфиру IX. Тем не менее мезогемин IX, дейтерогемин IX и копрогемин I превращаются в этой системе до соответствующих биливердинов [194]. С меньшими скоростями окисляются метгемальбумин, метгемоглобин, α - и β -цепи гемоглобина, гем—гемопексин и комплекс гемоглобин—гаптоглобин. Такое превращение макромолекул

становится возможным только после их расщепления протеолитическими ферментами.

Металлопорфирины содержащие какой-либо другой металл, но не железо не являются субстратами гемоксигеназы [198, 199].

Полный каталитический цикл биodeградации гема в гемоксигеназной реакции представлен на рис. 8.4. Вначале происходит связывание гема (Fe^{3+}) с белковой молекулой гемоксигеназы. Затем НАДФН-цитохром с редуктаза восстанавливает образовавшийся комплекс [гемоксигеназа—гем(Fe^{2+})]. Как и в случае других гемопротеинов, например, цитохрома Р450, впоследствии он становится оксигенированным [гемоксигеназа—гем(Fe^{2+})— O_2]. В отличие от предыдущих этапов, которые

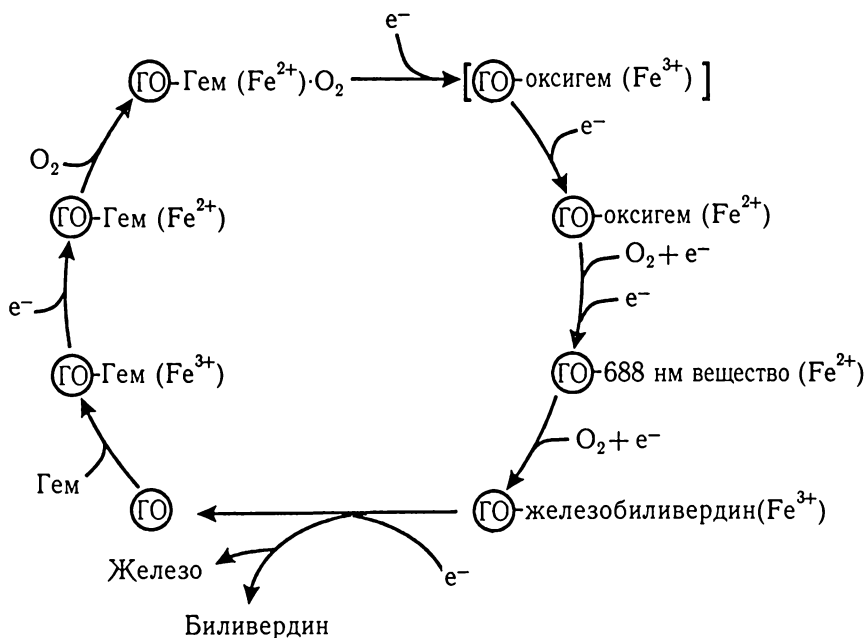


Рис. 8.4. Механизм биodeградации гема в гемоксигеназной (ГО) реакции

можно условно назвать подготовительными, последний является пусковым, так как в нем начинается истинный распад гема. В этом случае происходит внедрение атома кислорода в молекулу гема с возникновением первого метаболита α -оксигема. Впоследствии отщепляется α -углеродный атом, превращающийся в CO [195].

Предполагается существование еще одного промежуточного соединения в гемоксигеназном катализе. Его условно обозначили [688 нм — вещество (Fe^{3+})] так как в этой области спектра оно дает такую характеристическую картину [193].

Рассматриваемый интермедиат обладает высоким сродством к CO, образуя комплекс с максимумом поглощения при 688 нм. В результате одноэлектронного переноса и в присутствии O_2 это промежуточное вещество превращается в биливердин.

В настоящее время нет единого мнения по поводу структуры активной формы кислорода, внедряющейся в молекулу гема. Активность гемоксигеназы не ингибируется различными ловушками синглетного кислорода, супероксид-аниона и пергидроксильного радикала. Однако незначительные количества H_2O_2 обнаруживаются в процессе окисления гема реконструированной гемоксигеназой [193].

Представленные данные свидетельствуют о парадоксальных свойствах гемоксигеназы. Фермент использует субстрат в качестве кофактора, генерирующего активные формы кислорода для своей биodeградации. В этом случае мы имеем дело с так называемым аутокатализом, который не часто встречается в биохимии.

8.1.2. ФЛАВИНЗАВИСИМАЯ МОНООКСИГЕНАЗА

В предыдущих разделах были рассмотрены ферментные системы, катализирующие реакции окисления лекарств у атомов

углерода их молекулы. Целый ряд важных окислительных реакций связан с определенными центрами органических веществ, содержащих атомы азота. Такие ксенобиотики, как правило, вовлекаются в метаболические процессы четырех типов: N-гидроксилирование, N-окисление, N-деакилирование и дезаминирование.

Долгое время считалось, что ферменты, катализирующие эти реакции относятся к цитохром P450-зависимым. Затем оказалось, что действительно, некоторые из них, например процессы N-деалкилирования, катализируются как CYP, так и какими-то другими ферментами. Предварительное изучение свойств последних позволило выделить их в отдельную группу, которая получила название N-оксидаз или аминоксидаз смешанной функции. Такое название указывало на их широкую субстратную специфичность. В настоящее время установлено, что эти ферменты относятся к флавопротеинам, катализирующим окисление ксенобиотиков, содержащих нуклеофильный гетероатом (азот, сера, фосфор). Эта группа флавопротеинов была названа флавиномоноксигеназами (ФМО).

8.1.2.1. ТКАНЕВАЯ И ВИДОВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФМО

Изучение распространения ФМО в организме млекопитающих свидетельствует о его широких границах [200]. Фермент обнаружен во многих органах и тканях человека, свиньи, мышей, крыс и кроликов. По своим свойствам он напоминает бактериальную люциферазу и циклооксигеназу, а также близок флавопротеину цитозольной фракции *Trypanosoma cruzi*.

В настоящее время насчитывается по крайней мере пять изоформ фермента (ФМО1, ФМО2, ФМО3, ФМО4 и ФМО5). Все они содержат в своей молекуле 1 моль ФАД, нековалентно связанного с белком. Консервативным участком ФМО является N-терминальная часть, связывающая НАДФН и ФАД [201].

Наибольший успех достигнут при изучении тканевого распределения FMO при использовании в качестве экспериментального животного — кролика [202, 203]. Показано, что мРНК, кодирующая FMO1 экспрессируется в высоких количествах в печени и кишечнике. Для FMO2 основным органом являются легкие. Экспрессия мРНК, кодирующих FMO3, FMO4 и FMO5 наибольшая в печени и почках кролика и незначительная, либо вовсе не регистрируемая в легких. В целом, для большинства экспериментальных животных характерно преобладание FMO1 в печеночной ткани. В организме человека среди всех изоформ FMO доминирующей в печени является FMO3. В силу того, что изоэнзимы FMO значительно отличаются по субстратной специфичности друг от друга, довольно сложно переносить данные, полученные в опытах на экспериментальных животных, на человека.

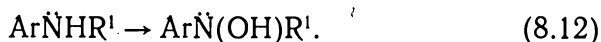
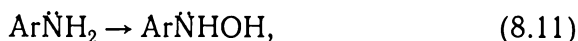
В отличие от CYP450 изоэнзимы FMO не индуцируются полициклическими углеводородами и барбитуратами. Однако отмечается [201], в некоторых случаях, противоположное действие ксенобиотиков на эти две ферментные системы. Так индол-3-карбинол (алкалоид крестоцветных) значительно ингибирует процесс экспрессии FMO1 в печени и кишечнике крыс, в то время как индуцирует содержание CYP1A1 в печени.

Подобно другим ферментам FMO находится под гормональным контролем. Так, печень самок мышей обладает большей суммарной ферментативной активностью, чем самцов. При этом у самок предпочтительной формой является FMO1, а у самцов — FMO3 [204]. Если FMO2 легких кроликов индуцируется прогестероном, то FMO2 почек — глюкокортикоидами [205].

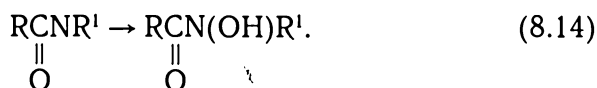
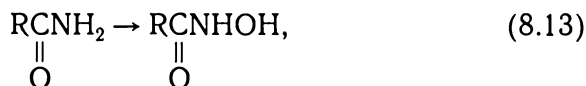
8.1.2.2. РЕАКЦИИ И МЕХАНИЗМЫ КАТАЛИЗА

Процессы N-гидроксилирования ксенобиотиков включает замещение одного атома водорода аминогруппы на гидроксил.

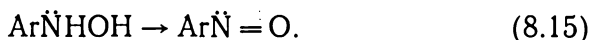
Продуктом реакции первичных, вторичных и ароматических аминов являются соответствующие гидроксиламины (8.9—8.12):



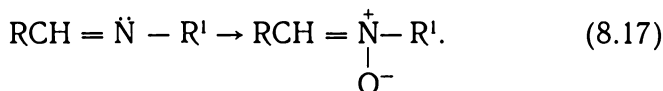
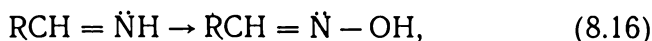
Если субстратами этих реакций являются алифатические или ароматические амиды, то их метаболиты — гидроксамовые кислоты (8.13, 8.14):



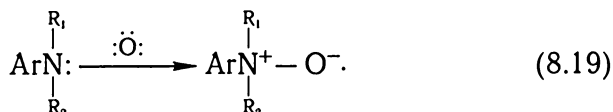
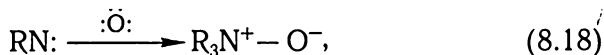
В свою очередь гидроксиламины неферментативно или ферментативно могут окисляться с образованием нитрозосоединений (8.15):



Известны также случаи метаболического превращения иминоазота в соответствующие оксимы (8.16) и нитроны (8.17):



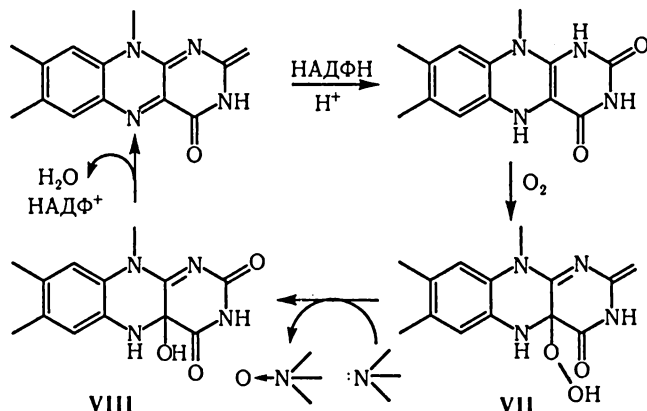
Для третичных алифатических и ароматических аминов наблюдается N-окисление, в котором единственная пара электронов азота распределена между атомами азота и кислорода (8.18, 8.19):



С биохимической точки зрения FMO отдаленно напоминает ксантиноксидазу и альдегидоксидазу (раздел 8.1.3), так как все эти ферменты в качестве простетической группы содержат ФАД. Однако роль этого кофермента в каталитических реакциях, осуществляемых с одной стороны FMO и с другой молибдензависимыми ферментами — различна.

Так, ксантиноксидазная реакция в своем механизме предполагает два каталитических центра. Молибден связывает восстанавливающие его субстраты и в процессе реакции превращается из состояния Mo (6) в состояние Mo (5) и Mo (4). Электрон переходит на конечный акцептор — ФАД, при участии железо-содержащих центров (Fe_2S_2) — I и II.

Отсутствие такой цепи переноса электронов в FMO компенсировано за счет другой более простой реакции, приводящей к генерированию в системе активных форм кислорода. Так доказано, что дигидрорибофлавин реагирует с молекулярным кислородом с образованием флавин-4α-оксипероксида (VII.).



Нуклеофильный субстрат, например, триметиламин атакуется дистальным кислородом гидроперекиси. В результате такого взаимодействия атом кислорода переносится на субстрат и одновременно образуется оксифлавин (VIII.). Лимитирующим звеном ФМО катализа является распад оксифлавина.

Отдельные стадии, характеризующие механизм каталитического действия ФМО изучены в достаточной степени при использовании фермента печени свиньи [200]. В последствие оказалось, что они практически не отличаются от аналогичных путей других экспериментальных животных.

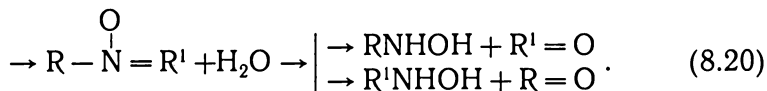
Так как в процессе восстановления флавина участвует НАДФН очень часто ФМО называют НАДФН-зависимой.

Физико-химические свойства флавин-4 α -оксипероксида свидетельствуют о том, что это слабый окислитель и поэтому неспособен атаковать атомы азота амидов, карбамидов, иминов, нитронов, оксимов, изоцианатов, нитрилов и гетероциклических ароматических аминов. В тоже время алифатические амины, гидроксиламины и гидразины можно отнести к типичным субстратам ФМО [206].

Третичные амины алифатического ряда (промазин, хлорпромазин, имипрамин, антитрипталин, бензамфетамин) и циклические (трифлюперазин, флюфеназин, мепередин, атропин, кокаин, морфин, никотин) в процессе окисления образуют полярные, относительно стабильные N-окиси (8.18, 8.19).

Вторичные алифатические (дезипрамин, нортриптилин) и циклические (перазин) амины, в отличие от третичных в ФМО катализе образуют несколько продуктов реакции. На первом этапе образуются гидроксиламины (8.10, 8.11). Они в свою очередь являются прекрасными субстратами ФМО, поэтому образуют в последствие нитроны (8.17).

Если в реакции окисления ФМО участвуют асимметрические вторичные амины (дезипрамин, нортриптилин), то в этом случае образуются нитроны, которые гидролизуются затем до двух различных альдегидов и двух первичных гидроксиламинов (8.20).

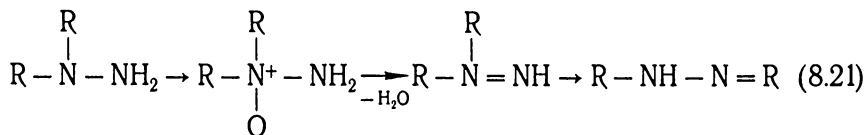


Гидролиз нитронов катализируется кислотами (донорами протонов). Однако этот процесс может проходить с довольно большой скоростью и в нейтральных растворах при комнатной температуре.

Что касается первичных ариламинов, то их принадлежность к субстратам ФМО весьма неопределенная. Только в случае 2-аминофлюоренона и пирролизидиновых алкалоидов в опытах с очищенной свиной ФМО были обнаружены N-окисленные продукты реакции [207]. Определение V_{\max} для большого числа различных азотсодержащих соединений позволило автору разделить их по отношению к ФМО на две группы: типичные и атипичные субстраты.

Быстрое окисление первичных гидроксиламинов не предполагает также относить их к субстратам ФМО. В тоже время вторичные гидроксиламины в ФМО катализе образуют соответствующие оксимы. Этот процесс практически идентичен цитохром Р450-зависимому катализу.

Печеночные ФМО некоторых экспериментальных животных катализируют N-окисление различных гидразинов (1,1-дизамещенных, 1,2-дизамещенных и монозамещенных). Предпочтительными субстратами в этом отношении оказались 1,1-дизамещенные гидразины [200]. В этой реакции 1,1-дизамещенные гидразины окисляются до гидразонов посредством перегруппировки азоалкинима с образованием N-оксида (8.21).

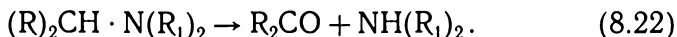


В дальнейшем гидразон гидролизуется до 1-замещенного гидразина.

Моно- и 1,2-дизамещенные гидразины окисляются до соответствующих метаболитов митохондриальной аминоксидазой и цитохромом P450.

К окислительным процессам, происходящим в клетках относятся и реакции деалкилирования ксенобиотиков. Возможность их реализации становится в том случае, когда молекула ксенобиотика содержит у атомов азота, кислорода или серы алкильные заместители. Ферменты, катализирующие эти реакции — разнообразны, но основными в N-деалкилировании участвуют цитохром P450 и FMO.

В результате N-деалкилирования ксенобиотика происходит разрыв связи углерод—азот, с образованием карбонильного соединения и деалкильного амина (8.22). В этом случае:



Мы скорее всего имеем дело с реакцией элиминирования, сопряженной с окислением. При этом активированный ферментом кислород внедряется в алкильный фрагмент.

Рассматривая реакцию 8.22 можно отметить значительное сходство процессов N-деалкилирования и дезаминирования. Так если атом азота содержит более чем один алкил или одну арильную и одну алкильную группы в результате ферментативного окисления образуются соответствующий амин и альдегид. В фармако-токсикологических исследованиях основной интерес представляет амин. Однако, в случае первичного амина ($R_1 = H$) в этой реакции образуется карбонильное соединение и аммиак. Здесь карбонильное соединение подвергается в дальнейшем различным превращениям. Следовательно, в первом случае реакции относятся к N-деалкилазным, а во втором — к дезаминазным.

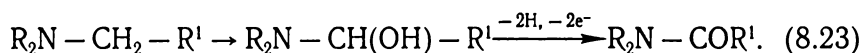
Несмотря на абсолютную идентичность, образующихся в цитохром P450 и FMO катализе продуктов N-деакилирования ксенобиотиков их механизмы реакций — различны.

При двухэлектронном пути гидроксилирования ксенобиотиков, приводящем к разрыву —C—N-связи, предполагают наличие

трех возможных механизмов, два из которых — прямое внедрение кислорода [208]. Начальным этапом реакции первого пути является окисление α -углеродного атома с образованием интермедиата — карбиноламина, который после обязательной перегруппировки превращается в соответствующие альдегиды и амины [20].

Карбиноламины могут быть сформированы и в химических реакциях с использованием в качестве окислителя MnO_2 . Такие реакции характерны для первичных, вторичных и третичных аминов. Так как третичные амины в процессе метаболизма образуют N-окиси, то это вещество и является промежуточным в их N-деалкилировании (второй путь). Эта реакция предполагает радикальный механизм, в котором индуцирующим агентом выступает Fe (III). В последствие N-оксид в результате дегидратации превращается в ион иммониа и, наконец, в карбиноламин. Третий путь предполагает непосредственное превращение амина в ион иммониа. Это реакция дегидрирования; протекает без внедрения кислорода.

В некоторых случаях вместо перегруппировки карбиноламин может в процессе дегидрирования превращаться в амид (8.23), который гидролитическим путем образует деалкильное производное и кислоту:

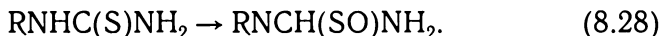
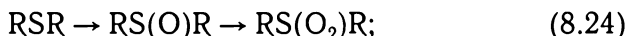


Дальнейшее окисление вторичных и первичных гидроксил-аминов осуществляется путем N-деалкилирования. Так вторичные гидроксил-амины окисляются до нитронов, а первичные — до оксимов. Оба типа «иммониа N-оксида» способны к гидролитическим превращениям до карбонильного соединения и соответствующего деалкилированного гидроксил-амина.

Следовательно, окисление центров молекул ксенобиотиков, содержащих атом азота, катализируемое ФМО довольно широко представлено в природе. Основываясь на принципе нуклеофильного механизма катализа и на основании физико-химических

свойств субстратов FMO можно предположить, что последние для своего активного каталитического превращения должны обладать незначительным основным свойством. Однако предсказание субстратной специфичности исходя из значений pK_a невозможно [201], так как здесь и другие факторы играют важную роль. Одно можно утверждать с уверенностью, что вещества, содержащие азот в их молекуле в состоянии Sp^3 -гибридизации и имеющие pK_a в интервале 5—10 не могут быть субстратами FMO.

Данные по окислению ксенобиотиков, содержащих в качестве функциональных групп серу, с помощью гидроперекиси, образующейся в FMO катализе, послужили основой выяснения механизмов этих реакций. Используя очищенную FMO печени свиньи были установлены [209] экзогенные субстраты, содержащие серу, которые способны окисляться в каталитическом цикле этого фермента. К ним относятся сульфиды и сульфоксиды (8.24), тиолы (8.25), дисульфиды (8.26) и тиокарбами́ды (8.28):



В тоже время такие эндогенные нуклеофилы как GSH, метионин, цистеин, а также пептиды, содержащие в своей молекуле тиолы или сульфиды, не взаимодействуют с FMO. Очевидно, разница в физиологических и чужеродных нуклеофилах заключается в том, что у последних несколько иной заряд молекул и другая липофильность.

Такие тиозефирьы как сулиндак сульфид является более специфичным субстратом FMO, чем четвертичные амины, что

обеспечивается значительно высокими нуклеофильными свойствами атома серы. Этим же объясняется тот факт, что тиоамиды окисляются ФМО более активно, чем сульфоксиды. Следует заметить, что тиоэфиры и тиоамиды также относятся к субстратам СYP450 (раздел 8.1.1.1). Их метаболизм в организме регулируется уровнями экспрессии СYP450 и ФМО и зависит от изоформ ферментов, а также имеет субстратную и тканевую специфичность [201].

В последнее время появились сообщения о том, что и некоторые фосфорсодержащие ксенобиотики (фосфины) могут быть субстратами ФМО печени мышей, крыс и кроликов [210].

Учитывая тот факт, что многие лекарственные препараты относятся одновременно к субстратам СYP450 и ФМО, очевидными становятся те трудности, с которыми сталкивается исследователь во время их типирования. Поэтому многие усилия направлены на поиск специфических субстратов или веществ ингибирующих или индуцирующих соответствующую реакцию с участием того или иного фермента.

Среди большого числа лекарственных средств наибольшее значение приобрел бенздамин, обладающий противовоспалительными свойствами, как маркер ФМО. Более того ценность реакции N-окисления бенздамина заключается в ее высокой чувствительности, так как метаболит (N-оксид) обладает значительной флуоресценцией [211].

Одним из интересных приемов определения ферментативной активности одновременно СYP450 и ФМО является использование диметиланилина в качестве диагностического субстрата [212]. Если реакцию превращения диметиланилина в N-оксид в инкубационной среде, содержащей микросомы печени животных проводить при значении рН 8,5—9, то определяется только ФМО. Изменение условий инкубации до физиологических значений рН позволяет определять лишь СYP450.

8.1.3. МОЛИБДЕНСОДЕРЖАЩИЕ ФЕРМЕНТЫ

Молибден в форме Mo^{6+} присутствует в активных центрах небольшого числа ферментов, которые выполняют совершенно различные функции (восстановление молекулярного азота и нитрата, окисление различных субстратов). Благодаря использованию методов ЭПР и применению специфических ингибиторов удалось получить важную информацию о функциональной роли молибдена в различных ферментах и сделать вывод о том, что этот металл может выполнять различные функции: принимать участие в связывании субстрата, участвовать во внутриферментном переносе электронов от донора к субстрату и в поддержании нативной структуры фермента.

Способ присоединения молибдена к белку неизвестен, но существуют данные, свидетельствующие о наличии в его окружении персульфидных групп ($-\text{S}-\text{S}-$) и о том, что гидрид-ион каким-то образом поделен между ними.

Все ферменты представляют собой димеры с идентичными субъединицами, каждая из которых содержит один Mo^{6+} , один ФАД и либо один (Fe_4S_4) -центр, либо два (Fe_2S_2) -центра. Электроны от восстановленного молибден-персульфидной структуры переносятся к ФАД, который в свою очередь находится в контакте как с молибденом, так и с железосероцентром, так что окисленный фермент может принимать 5 или 6 электронов. Такая молекулярная организация ферментов получила более расширенное наименование — флавожелезопротеины, содержащие молибден. Все они содержат в своем составе два атома молибдена, между которыми установлены определенные структурные и функциональные различия. Это позволяет предположить, что каждый из атомов молибдена у одного и того же фермента выполняет различные функции, такие как участие в связывании субстрата или в процессе внутриферментного переноса электронов.

Наибольший интерес в контексте данной монографии, среди ферментов этой группы, представляют ксантиноксидаза, ксантиндегидрогеназа и альдегидоксидаза.

8.1.3.1. КСАНТИНОКСИДАЗА-КСАНТИНДЕГИДРОГЕНАЗА

Ксантиноксидаза (ксантин : O_2 -оксидоредуктаза) и ксантиндегидрогеназа (ксантин : НАД-оксидоредуктаза) — ферменты, катализирующие окисление лекарственных веществ, производных пуринов, пиримидинов, птерицинов и альдегидов. В качестве акцепторов в реакциях этих ферментов кроме O_2 или НАД, могут служить ферредоксин, *цитохром с*, аналоги НАД и различные красители. Показано, например, что ксантиноксидаза молока переносит электроны на кислород, но не реагирует с НАД или с кlostридиальным ферредоксином. Фермент выделенный из печени экспериментальных животных, использует НАД в качестве акцептора, но плохо реагирует с кислородом или ферредоксином.

Хотя разные авторы, в зависимости от активности по отношению к акцептору, присваивали ферменту различные названия (ксантиноксидаза или ксантиндегидрогеназа), по-видимому, во всех случаях речь идет об одном и том же ферменте (ферментном комплексе). Доказательства такого положения получены при исследовании этих ферментов в гомогенатах различных тканей млекопитающих. Было показано, что в тканях нативный фермент находится в виде дегидрогеназы, а при очистке превращается в оксидазу [216]. Очищенную ксантиноксидазу можно вновь превратить в ксантиндегидрогеназу после инкубации с дитиотреитолом.

Следовательно, ксантиноксидаза и ксантиндегидрогеназа являются различными формами одного и того же фермента, имеющего димерную структуру и молекулярную массу 300 кД. Они относятся к цитозольным ферментам, кроме фермента, содержащегося в молоке и связанного с жировыми каплями [217].

Недавно ксантиндегидрогеназа человека была клонирована и блотанализом определена соответствующая мРНК. Было показано [218], что фермент в значительных количествах локализован в головном мозге, печени, в сердечной мышце, скелетных

мышцах, поджелудочной железе, тонком и толстом кишечнике. Оба фермента также находятся в плаценте человека и ген, кодирующий их, локализован в хромосоме 2p22 [218, 219].

Аминокислотная последовательность клонированной ксантиндегидрогеназы человека на 91 % идентична ксантинооксидазам мышей и крыс [219]. Пожалуй наименьший успех принадлежит исследованиям в области изучения изоформ ферментов. С некоторой долей достоверности сейчас можно говорить только о двух изоформах ксантиндегидрогеназы человека [201].

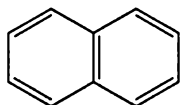
Половые различия в активности ксантинооксидазы отмечены для организма крыс. Для самок наблюдается лишь половинная активность этого фермента. В тоже время для организма человека такая закономерность не выявлена, в случае использования в качестве субстрата кофеина [220].

Особенно чувствительна эта ферментная система к различным патологическим состояниям организмов. Уменьшение коронарного кровотока, приводящего к ишемии, является потенциальным окислительным стрессом для клеточных структур. Возникающие при этом альдегиды, как следствие перекисного окисления липидов, изменяют активность ферментов. Так, малоновый диальдегид увеличивает активность ксантиндегидрогеназы и уменьшает ксантинооксидазные свойства. В противоположность этому факту 4-оксиноненал усиливает действие только ксантинооксидазы [201]. В процессе ишемии определенный вклад в транскрипционную активацию ксантиндегидрогеназы вносит и оксид азота, ингибирующий действия ксантинооксидазы.

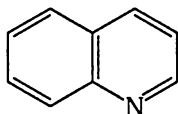
Ксантинооксидаза в ряде случаев ответственна за проявление токсических эффектов. Липополисахариды, относящиеся к продуктам жизнедеятельности бактерий увеличивают ксантинооксидазную активность в различных тканях мышей, за счет транскрипционных и посттранскрипционных механизмов. Результатом такой реакции является возникновение активных форм кислорода, с последующими цитотоксическими проявлениями.

8.1.3.1.1. СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

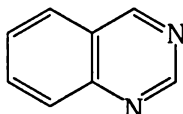
Субстратная специфичность ферментов хорошо иллюстрируется на примере бициклических ароматических веществ (IX—XII):



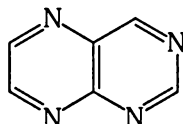
IX



X



XI



XII

Нафталин (IX) окисляется в живых организмах до 1- и 2-нафтолов с участием CYP450. Это вещество не является субстратом ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы. Появление азота в качестве гетероатома в молекуле хинолина (X) делает это вещество субстратом этих ферментов, наряду с CYP450. Последующее увеличение числа атомов азота, как это имеет место в молекуле хиназолина (XI) и приводит к тому, что этот субстрат в основном окисляется ксантиноксидазой и альдегидоксидазой до хиназолин-4-она и дальше до хиназолин-2,4-диона. В этом случае отмечены лишь следовые количества метаболитов фенольной структуры, т. е. образующихся в цитохром P450-зависимом катализе. И наконец, птеридин (XII) относится только к субстратам молибдензависимых монооксигеназ, так как окисляется до птериден-2,4-диола альдегидоксидазой и до птеридин-2,4,7-триона ксантиноксидазой [221]. Следовательно, рассматриваемые ферменты атакуют (окисляют) углеродный атом ароматического кольца, который располагается по соседству с гетероатомом (азотом). Это происходит потому, что они катализируют реакции с участием нуклеофилов и это отличает их от цитохром P450-зависимых ферментов.

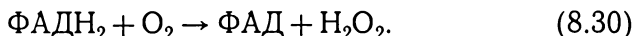
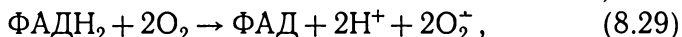
В отличие от бициклических соединений, содержащих в качестве гетероатома азот, их моноциклические аналоги (пиридины,

пиримидины, пиразины, пиридазины) не взаимодействуют с ферментами *in vitro*. Однако, если эти субстраты содержат заместители (как это имеет место в молекуле 3-ацетилпиримидина, 2-оксипиримидина, 4-оксипиримидина) они окисляются ксантиноксидазой и альдегидоксидазой.

Эксперименты с $^{18}\text{O}_2$ показали, что окисляемые субстраты включают в себя атом кислорода из воды, а не из молекулярного кислорода.

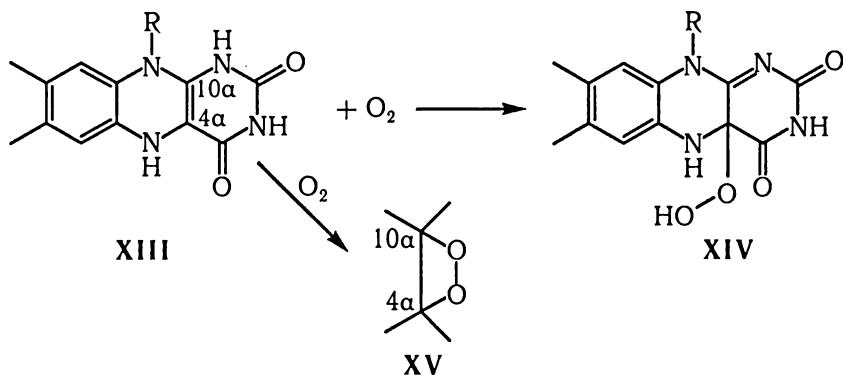
Молекулярная организация и механизм действия этой группы ферментов в достаточной степени изучены на примере ксантиноксидазы молока, так как эта форма методически легко может быть очищена и к тому же является наиболее устойчивой к внешним воздействиям.

Формально-кинетический процесс ксантиноксидазной реакции описан схемой с двумя субстратами, восстановителем и окислителем. В ней выделяют три участка: 1) центр окисления субстрата; 2) центр переноса электронов и 3) центр восстановления O_2 . Элементарные стадии реакций в достаточной степени рассмотрены в монографии [161]. В этой связи лишь отметим, что O_2 взаимодействует с ферментом в две стадии, с образованием активных форм кислорода (8.29, 8.30):



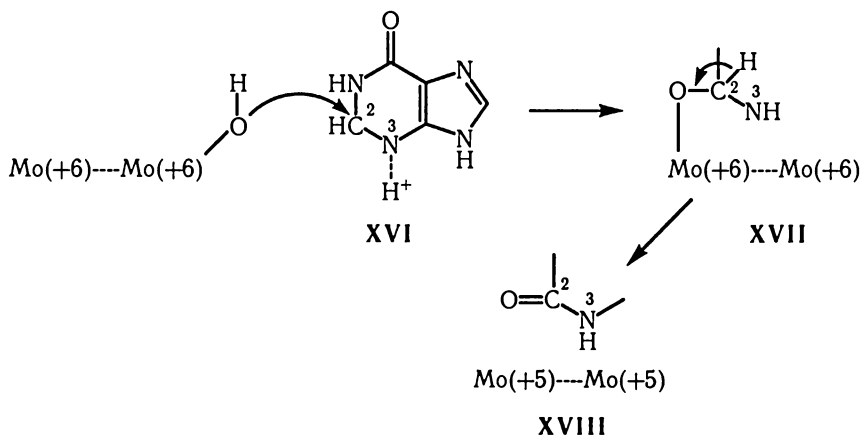
Супероксид-анион и перекись водорода в этих реакциях генерируются в результате одно- или двухэлектронного переноса.

Существуют две точки зрения, характеризующие структуру промежуточного соединения, которое образуется в процессе окисления молекулярным кислородом флавиновых нуклеотидов (дигидрофлавинов XIII). Во-первых, это может быть аддукт в положении 4а (XIV), во-вторых — циклическая перекись (XV), как результат присоединения O_2 к атомам углерода в положениях 4а и 10а [102]:



Последующие превращения соединений XIV или XV могут приводить к образованию супероксид-аниона или перекиси водорода. Так, например, распад аддукта XIV в результате протонирования внутреннего атома кислорода может привести к образованию H_2O_2 и окисленного флавина (8.30).

Наличие атомов Мо в составе ксантиноксидазы доказано методом ЭПР и не вызывает сомнения. Однако его роль в каталитическом акте фермента еще далека от окончательного решения. Одним из распространенных взглядов, определяющих значение Мо в этих реакциях, является предложенный Гамильтоном механизм восстановления металла на первом этапе:



В результате присоединения координированной с металлом гидроксильной группы возникает аддукт XVII. По-видимому, далее он может окисляться посредством переноса электронов через кислород на каждый атом Мо. Получив по одному электрону они образуют два атома Мо (+5).

Еще на один момент хотелось бы обратить внимание. В отличие от ранее рассматриваемых ферментов ксантиноксидаза содержит прочно связанное железо не координированное с ядром гема. Этот фермент относится к так называемым железосерным белкам. Соотношение железа и «лабильной серы» для таких белков составляет 1:1.

Рентгеноструктурный анализ таких белков свидетельствует о том, что их полипептидная цепь обернута вокруг железо-серного кластера, содержащего боковые цепи остатков аминокислот и по два атома серы и железа. По набору ряда параметров кластер в ксантиноксидазе относят к типу Fe_2S_2 . Полагают, что он может находиться в двух состояниях, отличающихся *g*-факторами и температурной зависимостью интенсивности сигналов ЭПР [161]. Понятно, что такой кластер выполняет свою функцию в центре переноса электронов, а именно в процессе окисления восстановленной формы фермента кислородом.

Подводя итог рассмотрения свойств ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы отметим, что по своей структуре это один фермент. Однако в силу определенных обстоятельств транспорт электронов в цепи фермента может следовать в район железо-серного кластера к ФАД, а затем к акцептору — O_2 (оксидазная активность) или к НАД^+ (дегидрогеназная активность). Оба фермента осуществляют каталитическое окисление субстратов, имеющих электрон-дефицитные Sp^2 -гибридизованные атомы углерода, связанные в гетероцикле с атомом азота (пурины, пиримидины).

Очевидно структура акцептора электронов и определяет некоторые особенности субстратной избирательности в каталитических актах ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы.

В большей степени это относится к региоспецифичности окисления одного и того же субстрата.

Аллопуринол, лекарство для лечения подагры, в организме пациентов превращается с помощью ксантиноксидазы в аллоксантин. Этот метаболит является специфическим ингибитором ксантиноксидазы. Поэтому в диагностических целях используют как аллопуринол так и его метаболит [222].

Среди лекарственных средств типичных субстратов ксантиноксидазы-ксантидегидрогеназы можно назвать также митомицин С, который с помощью данных ферментов активируется в цитотоксическое производное, обладающее алкилирующими свойствами [223]. Эти ферменты участвуют в метаболизме 6-меркаптопурина и 2,6-дифторпурина, вовлекая их в эффект первичного прохождения.

Большинство противовирусных препаратов, производных пурина, имеют один значительный недостаток — низкую биодоступность. Используя принцип создания пролекарств в ряде случаев получены гидрофобные производные, имеющие высокую биодоступность, например, 6-деоксиацикловир. В организме пациентов он с помощью ксантиноксидазы, в области биологической мишени превращается в ацикловир. В аналогичных условиях 2'-флюороарабинодидоксипурин (высокая биодоступность) превращается в активное химиотерапевтическое средство 2'-флюороарабинодидоксинозий [224].

8.1.3.2. АЛЬДЕГИДОКСИДАЗА

Альдегидоксидаза — цитозольный фермент по своей структуре напоминающий ксантиноксидазу—ксантиндегидрогеназу однако не являющийся альтернативой последней, так как не участвует в транспорте электронов в дегидрогеназно-оксидазном цикле. Альдегидоксидаза существует исключительно в окисленной форме, так что электроны получает от восстановленного

субстрата (флавин). Попытка превратить фермент в дегидрогеназу, заменив молекулярный кислород на НАД⁺, не увенчалась успехом.

Подобно ксантиоксидазе альдегидоксидаза в процессе каталитического акта генерирует активные формы кислорода, участвующие в реакциях с ацетальдегидом и образующие при этом соответствующие радикалы.

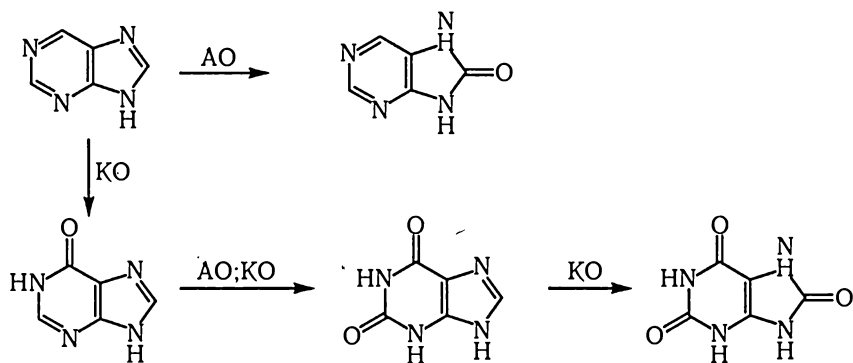
Экспрессируется альдегидоксидаза в различных органах и тканях животных и человека. Особенно высоки уровни активностей этого фермента в печени, легких и селезенке травоядных млекопитающих [221, 222]. В организме человека ее распространение несколько ограничено и включает, практически, только печень, а следовые количества наблюдаются в почках и сердечной мышце [220].

В настоящее время достигнуты значительные успехи в области препаративной энзимологии, позволившие очистить и выделить в гомогенном состоянии фермент кролика, морской свинки, бабуина и человека [225]. Его молекулярная организация и особенно структура активного центра была идентифицирована подбором многочисленных субстратов (хиназолины, фталазины) в качестве маркеров. Уровни активности фермента могут быть представлены следующим порядком: кролик < морская свинка < бабуин < человек. Эти и некоторые другие данные [226] свидетельствуют о том, что в этом плане, наиболее удачной моделью человеческой альдегидоксидазы могут быть ферменты морской свинки и особенно бабуина. Необходимо также отметить, что в организме собак этот фермент не зарегистрирован [226].

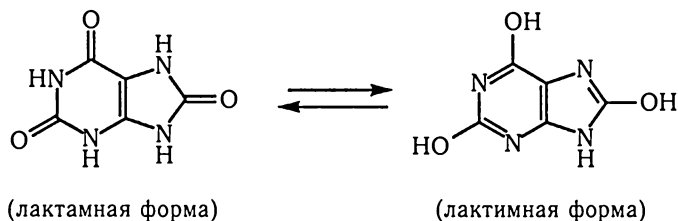
Несколько необычная форма фермента экспрессируется в нейтрофилах морских свинок, катализирующего окисление альдегидов и некоторых гетероциклических соединений, но не производных пурина [221].

Аналогично ксантиоксидазе, гормональный контроль альдегидоксидазы включает два направления. Одно из них зависит от андрогенов, приводящее к увеличению активности фермента, а другое — от эстрогенов, понижающее ее [201].

Несмотря на близость ксантинооксидазы и альдегидоксидазы по отношению к субстратам окисления (IX—XII) и идентичность механизма действия (раздел 8.1.3.1.1), в некоторых случаях ферменты отличаются позиционной избирательностью их действия. Так, альдегидоксидаза (АО) катализирует реакцию окисления пуринов в положении 8, а ксантинооксидаза (КО) — в положении 2 и 6. Образовавшийся в ксантинооксидазной реакции метаболит (6-оксипурин) может быть субстратом обоих ферментов. И, наконец, только 2,6-диоксипурин окисляется в положении 8 ксантинооксидазой до мочевой кислоты [217]:



Мочевая кислота, подобно другим производным пурина, существуют в лактим-лактамной таутомерной форме.



Лактимная форма мочевой кислоты является слабой кислотой ($pK'_1 = 4,5$; $pK'_2 = 10,3$) и образует соли (одно- или двузамещенные натриевые или калиевые ураты).

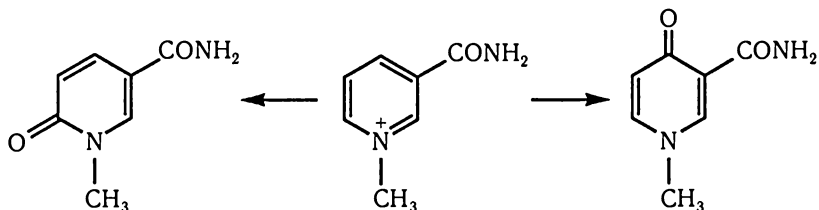
Мы хотели бы обратить внимание еще на одну деталь, характеризующую взаимоотношение в живых организмах ксантиоксидазы и альдегидоксидазы. В опытах *in vitro* оба фермента взаимодействуют с гипоксантином с различными константами связывания, образуя при этом ксантин. Известно и то, что в процессе распада нуклеиновых кислот или нуклеозидов образуются в большей степени гипоксантин и гуанин, которые только ксантиоксидазой окисляются до мочевой кислоты. Альдегидоксидаза практически инертна по отношению к эндогенным пуринам. В случае ксантинурии (наследственное заболевание, связанное с дефицитом ксантиноксидазы) в моче пациентов обнаруживается не гипоксантин, а ксантин [221]. Следовательно, действие альдегидоксидазы реализуется только в критических (патологических) ситуациях. Об этом свидетельствует еще один факт [217, 227]. Если экспериментальным животным вводить ингибитор ксантиноксидазы аллопуринол, то в их моче присутствует весьма необычный метаболит пуринов 6,8-диоксипурин.

Пуриновые нуклеозиды с очень малой скоростью окисляются молибдензависимыми оксидазами [221]. По-видимому, для окисления азотистого основания необходимым является гидролиз β -гликозидной связи нуклеозида.

Катионы N-гетероциклических соединений — вторая группа субстратов молибдензависимых оксидаз и особенно альдегидоксидазы. Положительный заряд препятствует реакции электрофильных агентов с гетероатомом и сильно дезактивирует углеродные атомы кольца. Поэтому облегчается атака нуклеофильных агентов в α - или некоторые другие положения по отношению к гетероатому.

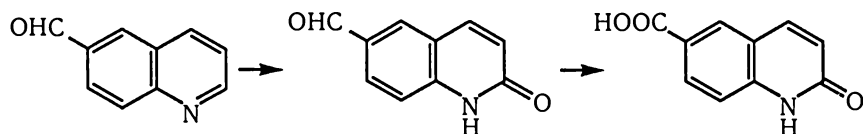
Для гетероциклических катионов отмечено [217] уменьшение значения K_m (альдегидоксидаза) при повышении pH среды. Для альдегидов и незаряженных гетероциклических соединений наблюдается обратная закономерность. Ксантиноксидаза практически не катализирует окисление катионов пиридиния даже при pH выше 9,3.

Для N¹-метилникотинамида обнаружены [221] два альтернативных пути его окисления альдегидоксидазой:

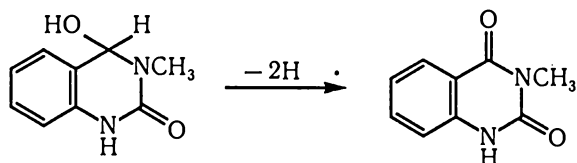


Описаны [228] некоторые закономерности ксантиноксидазного и альдегидоксидазного катализа альдегидов. В целом их можно свести к следующим пунктам. Во-первых, оба фермента значительно уступают другим, например, альдегиддегидрогеназе по активности. По-видимому, в организме они не играют большого значения в реакциях окисления альдегидов. Во-вторых, в отличие от альдегиддегидрогеназы альдегидоксидаза окисляет тогда субстраты с оптимальной скоростью, когда в их алифатическом скелете содержится три углеродных атома. При наличии шести углеродных атомов и более альдегидоксидаза практически не взаимодействует с такими субстратами. В-третьих, ксантиноксидаза, за небольшим исключением, практически не окисляет эндогенные альдегиды [229].

Ароматические альдегиды (бензальдегид) являются более специфичными субстратами для альдегидоксидазы, чем для альдегиддегидрогеназы [217]. Однако если в одной молекуле содержится фрагмент гетероциклического кольца и ароматического альдегида (хинолин-6-альдегид), то альдегидоксидаза на первом этапе окисляет только α -углеродный атом, а затем альдегидный фрагмент [150]:



В заключение отметим одну необычную реакцию, катализируемую альдегидоксидазой. Установлено [222], что этот фермент может осуществлять процесс дегидрирования ксенобиотиков, т. е. обладать свойствами дегидрогеназы. В качестве субстрата использован в этом случае хлорид-3-метилхиназолин-2-он:



Для ксантиноксидазы аналогичной реакции не обнаружено. Специфичного субстрата альдегидоксидазы к настоящему времени не существует. Поэтому с целью идентификации и особенно определения активности в присутствии ксантиноксидазы используют ингибиторы. Так, менадион ингибирует окисление аллопуринола, а гидралазин карбазерана. Метадон также используется в качестве ингибитора ($K_i = 10^{-7}$ м) альдегидоксидазной реакции [230]. Интересным является тот факт, что SKF-525 А, ингибитор широкого спектра действия семейства СYP450, замедляет скорость реакции окисления карбоксиамида акридина с участием альдегидоксидазы [231].

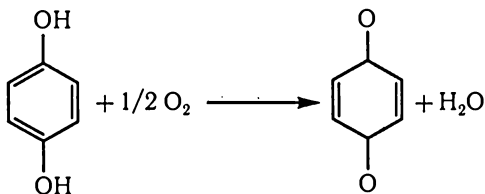
В заключение отметим, что молибдензависимые ферменты принимают участие в реакциях восстановления (раздел 8.8.2) ряда ксенобиотиков [217, 221]. Среди наиболее распространенных реакций восстановления, катализируемых этими ферментами следует назвать трансформацию гидроксамовых кислот до амидов, эпоксидов до олефинов, сульфоксидов (сулиндок) до активных сульфидов.

Помимо активации субстрата и переноса электронов и протонов возможно участие молибдена в поддержании нативной структуры фермента. В свою очередь, белковая часть фермента может участвовать в поддержании каталитической активности свободнорадикальной формы молибдена.

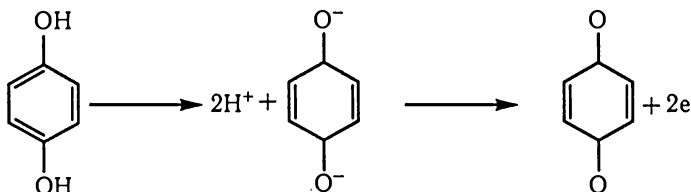
8.1.4. ДЕГИДРОГЕНАЗЫ

В предыдущих разделах указывалось, что реакции, включающие перенос электронов, называются окислительно-восстановительными ($\text{Fe}^{3+} \leftrightarrow \text{Fe}^{2+}$). Характер реакций между ковалентными соединениями привлекает понятие электроотрицательности и различной степени поделенности электронов. На примере любой реакции, катализируемой цитохром Р450-зависимыми ферментами происходит замена связи $\text{C}-\text{H}$ на связь $\text{C}-\text{OH}$. Поскольку кислород более отрицателен, чем водород, он оттягивает электроны от атома углерода. Дипольный момент ксенобиотика характеризует величину смещения электронов от атома углерода, подвергшегося окислению, к атому кислорода, который восстановился, хотя при этом оба атома всего лишь «поделили» электронную пару.

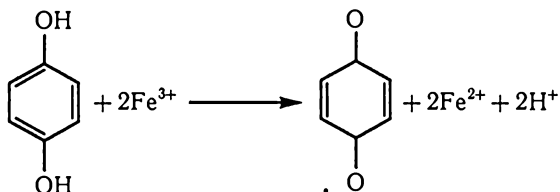
В некоторых других случаях органические вещества окисляются по существу отнятием водорода, т. е. дегидрированием. Например, окисление гидрохинона можно представить следующим образом:



Эту реакцию можно также рассмотреть по стадиям, первая из которых является кислотной диссоциацией, а вторая сводится к потере электронов:

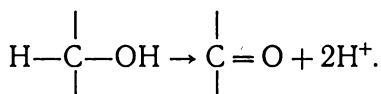


Если бы окислителем был ион трехвалентного железа, суммарную реакцию можно было бы записать следующим образом:

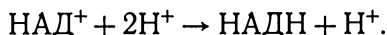


В приведенном примере протоны и электроны независимо отделяются от окисляемой молекулы.

Одним из примеров наиболее универсальных реакций биологического окисления является дегидрирование спирта до кетона или альдегида.



Известно, что два удаляемых атома водорода перемещаются на водород-переносящие коферменты (НАД, НАДФ, ФАД и ФМН). При восстановлении НАД только один из атомов водорода, удаляемых из молекулы спирта, связывается с НАД, превращая его в НАДН, тогда как другой становится свободным протоном:



Исследование дейтерированных спиртов и их окисление под действием НАД показало, что дегидрогеназы катализируют прямой перенос к НАД^+ водорода, который связан с углеродом спиртовой группы. В то же время водород, присоединенный к кислороду спирта, освобождается в среду в виде H^+ .

Упомянутые выше наблюдения дают основание рассматривать эти акты биологического окисления (дегидрирования) как удаление гидрид-иона H^- совместно с протоном H^+ , а не как

удаление двух атомов водорода. Таким образом, НАД⁺ и НАДФ⁺ обычно рассматривают как коферменты, акцептирующие гидрид-ион. Не вдаваясь в детали истинного механизма реакции дегидрирования, удобно классифицировать большинство актов метаболического переноса водорода с позиции переноса гипотетического гидрид-иона. Эту частицу можно считать нуклеофилом, который может отщепляться от субстратов (дегидрирование) или присоединять к двойным связям (восстановление, раздел 8.2). Следовательно, дегидрогеназы могут осуществлять реакции в прямом и противоположном направлениях.

Отличает дегидрогеназы от монооксигеназ то, что первые никогда в качестве акцептора электронов не используют кислород и локализуются в большинстве случаев в растворимой фракции клеток, т. е. не являются мембраносвязанными. Исключением может быть ксантиноксидаза, которая в определенных условиях переходит в ксантиндегидрогеназу (раздел 8.1.3.1). Для альдегидоксидазы такая манипуляция не возможна (раздел 8.1.3.2).

Среди других представителей этой группы ферментов наиболее изученными и интересными с точки зрения окисления лекарственных средств являются алкогольдегидрогеназа (ADH) и альдегиддегидрогеназа (ALDH).

Интерес к ADH обусловлен также и тем, что она играет определенную роль в промежуточном обмене в организме этилового спирта, который образуется в клетке естественным путем либо может быть внесен туда извне. Отсюда, ADH — объект пристального внимания исследователей в связи с социальным заказом, обусловленным алкоголизмом. Несмотря на то, что согласно современным представлениям алкогольная мотивация [232] по своим генетическим и нейробиологическим механизмам является независимым феноменом от других проявлений, например, фармакокинетики и метаболизма этанола [233] все же активность ADH вносит свой вклад и в эти процессы. Фермент широко представлен в животных тканях: печени, почках,

мышце сердца, слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта [234]. В печени присутствуют две различные субъединицы ADH, каждая из которых содержит два Zn^{2+} , одни из которых стабилизирует третичную структуру фермента. Это достигается благодаря связям с лигандами сульфгидрильных групп остатков цистеина в положениях 97, 100, 103 и 111 молекулы. Другой атом цинка связан с сульфгидрильными группами цистеиновых остатков в положениях 46 и 174 и с имидазольной группой гистидина 67. Присоединение НАД⁺ к ферменту происходит таким образом, что возможен перенос гидрид-иона.

Две различные субъединицы ADH дают начало электрофоретически различным изоформам. В тканях крыс выделено три изофермента. В печени содержатся ADH-2 и ADH-3, имеющие относительно групповую субстратную специфичность [235]. Так ADH-2 имеет высокую активность к спиртам и альдегидам с короткими, средними и длинными алифатическими цепочками. В то же время ADH-3 с довольно высокими скоростями дегидрирует спирты со средними и длинными алифатическими цепочками и является не активным по отношению к этанолу. Данная изоформа весьма эффективна в реакциях восстановления 3-кетостероидов и ретиналя до соответствующих 3 β -оксистероидов и ретинола.

Для ADH характерной особенностью является половой диморфизм, зависящий во многих случаях от содержания в организме тестостерона. Экспериментальным путем показано [236], что активность печеночной ADH самок крыс значительно превышает этот показатель у самцов. Для ALDH такая закономерность не отмечена.

Отметим также, что окисление этанола ADH до ацетальдегида не единственный путь, имеющий место в клетке. Существует так называемая микросомная этанолокисляющая система (МЭОС), характеризующаяся [237] широкой субстратной специфичностью, так как участвует в метаболизме этанола, метанола, пропанола, бутанола и пентанола. Путем реконструкции МЭОС установлено, что данный ферментный комплекс

содержит СУР450, НАДФН-цитохром с редуктазу и фосфолипиды (раздел 8.1.1.1). Каталаза (раздел 8.1.1.3) в пероксидазных реакциях участвует в окислении метанола, этанола и других спиртов. Скорость реакции зависит от скорости образования пероксида водорода, концентрации каталазы и спирта. Фермент с одинаковыми скоростями окисляет метанол и этанол, в отличие от АДН, и активность каталазы уменьшается когда субстратами служат высшие спирты.

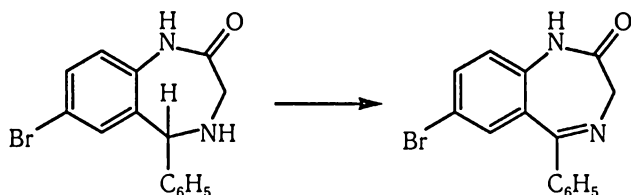
Многие циклические спирты ферментативным путем дегидрируются до соответствующих кетонов. В частности, 3-оксигексобарбиталдегидрогеназа катализирует окисление 3-оксигексобарбитала до 3-оксоаналога. Фермент, выделенный и очищенный из растворимой фракции морской свинки значительно отличается по своим свойствам от аналогичного фермента, изолированного из печени кролика [238]. Это прежде всего касается субстратной специфичности. Оптимум рН НАД-зависимой формы фермента составляет 8,7, а НАДФ-зависимой — 8,9.

Аценафтен-1-ол в организме экспериментальных животных превращается в кетон, находящийся в таутомерном равновесии с 1-оксиаценафтеленом. В реакции с дегидрогеназой, катализирующей данный процесс, в качестве кофактора используется НАДФ [239]. В то же время окисление *цис*- и *транс*-аценафтен-1,2-диолов до соответствующего нафтахинона осуществляется микросомной дегидрогеназой, использующей НАД в качестве акцептора гидрид-иона.

Вторичные спирты подвергаются процессам дегидрирования в микросомах и растворимой фракции гепатоцитов. Это касается прежде всего 5-бром-2-аминобензгидрола, использованного нами в качестве субстрата соответствующего фермента [240]. Продуктом реакции был 5-бром-2-аминобензофенон, по концентрации которого типировалась реакция дегидрирования. Было отмечено, что в микросомах гепатоцитов крыс процесс протекает интенсивнее. Однако при увеличении в инкубационной среде субстрата до 300 ммоль количество образовавшегося продукта реакции достоверно снижается в микросомах и увеличивается

в растворимой фракции. Замена НАД на НАДФ приводит к уменьшению количества образовавшегося продукта в микросомах к увеличению его в растворимой фракции. Следует отметить, что в общем, ферменты дегидрирующие циклические спирты, по многим свойствам напоминают 3β - и 11β -оксистероиддегидрогеназы [241].

Независимо друг от друга, нами [242] и венгерскими учеными [243] был обнаружен необычный процесс дегидрирования, затрагивающий гетероциклическое кольцо тетрагидро-1,4-бенздиазепинов. В частности, мы в своих исследованиях использовали следующий субстрат и продукт реакции дегидрирования:



Такой тип превращения вещества широко распространен в организме и обнаруживается в печени, почках и надпочечниках крыс, морских свинок и мышей [242]. В постмитохондриальной фракции гепатоцитов и клеток надпочечников дегидрогеназная активность увеличивалась в ряду крысы > мыши > морские свинки. В клетках почек дегидрирование субстрата в организме мышей и морских свинок примерно одинаково и несколько выше, чем в организме крыс. Следует также отметить, что изучаемый субстрат претерпевает процесс дегидрирования и в микросомной фракции. Оказалось, что скорость восстановления НАД в инкубационной среде с субстратом и микросомами гепатоцитов и клеток почек выше у морских свинок, чем у мышей. Скорость дегидрирования субстрата растворимой фракцией (после осаждения микросом) клеток печени мышей и морских свинок почти одинаковы, но несколько выше, чем у крыс. Активность фермента в растворимой фракции клеток почек

морских свинок и мышей выше, чем у крыс. Микросомы и растворимая фракция надпочечников исследуемых органов с одинаковой скоростью дегидрируют субстрат, и процесс не зависит от вида экспериментальных животных.

Следовательно, по своей локализации ферменты, катализирующие дегидрирование тетрагидро-1,4-бенз diaзепина отличаются от других дегидрогеназ (раздел 8.3.1.1). В частности, активность 3-оксигексобарбиталдегидрогеназы равномерно распределена в постмитохондриальных фракциях клеток печени, почек и надпочечников [238]. Но в гепатоцитах морских свинок и мышей она в два-три раза выше, чем в почках и надпочечниках.

Увеличение концентрации ионов водорода приводит к резкому снижению процесса дегидрирования тетрагидро-1,4-бенз diaзепина. Оптимальная активность достигается при pH 9 в обеих фракциях гепатоцитов морских свинок [244]. Максимальное действие 3-оксигексобарбиталдегидрогеназы, по данным [238], наблюдается при pH 8,7 (НАД-зависимая форма) и 8,9 (НАДФ-зависимая).

Внесение в инкубационную среду алкогольдегидрогеназы, в случае микросом и растворимой фракции, не влияло на скорость дегидрирования.

Полученные результаты свидетельствуют об особенностях ферментов, катализирующих дегидрирование тетрагидро-1,4-бенз diaзепинов, и их отличительных свойствах от других дегидрогеназ.

Физико-химические свойства тетрагидро-1,4-бенз diaзепинов и их субстратная принадлежность к дегидрогеназам, во многом определяет их дальнейшую метаболическую модификацию [245, 246] и фармакокинетику [247].

Дальнейшее окисление альдегидов, на ряду с ксантиноксидазой (раздел 8.1.3.1) и альдегидоксидазой (раздел 8.1.3.2) осуществляет ALDH [248]. Одна из изоформ (НАД-зависимая), этого фермента локализована в митохондриях и растворимой фракции клеток животных. В растворимой фракции фермент представлен двумя формами, отличающимися друг от друга

субстратной специфичностью. Наиболее изучена ALDH печени лошади. Выделенный в чистом виде фермент обладает широкой субстратной специфичностью и катализирует окисление алифатических альдегидов (пропиональдегида, 2-хлорацетальдегида, глицеральдегида, финилацетальдегида). Ароматические альдегиды (бензальдегид, *о*-нитробензальдегид и фурфуральдегид) не взаимодействуют с указанным ферментом.

8.2. ВОССТАНОВЛЕНИЕ

С химической точки зрения под восстановлением соединения (при наличии соответствующей структуры) с помощью ферментов подразумевают реакции переноса водорода от донора (НАДН, НАДФ) и акцептору (субстрату). Следовательно, во многих случаях этот процесс можно назвать гидрированием и он является противоположным реакциям дегидрирования. Учитывая тот факт, что ферментам, катализирующим реакции дегидрирования субстратов характерна и обратная реакция, многие из них относятся и к редуктазам, т. е. катализирующим восстановление веществ. Так алкогольдегидрогеназа осуществляет реакцию восстановления карбонильной группы, дегидрогеназы аминокислот восстанавливают шиффовы основания, а альдегиддегидрогеназа — тиозефир. Еще одной особенностью ферментативного восстановления можно считать тот факт, что несколько ферментов могут катализировать одну и ту же реакцию. Перечень таких реакций представлен в монографии [249] и один из характерных примеров заимствован нами.

Так изомеры *о*-, *м*-, *п*-нитробензойной кислоты могут превращаться в соответствующие аминокислоты с помощью следующих ферментных систем: гомогенатов печени крыс, кролика, плаценты человека, микросомы печени крыс, альдегидоксидазы печени крыс, ДТ-диафоразы, ксантиноксидазы молока, микрофлоры желудочно-кишечного тракта крысы

(*in vitro*, *in vivo*), суспензии анаэробных бактерий, выделенных из слепой кишки крысы. Идентифицированы также и некоторые микроорганизмы, осуществляющие этот процесс в аэробных или анаэробных условиях. Поэтому при описании процессов восстановления веществ рассматривают определенный тип реакции (например, восстановление нитрогрупп до аминопроизводного), а реакцию, катализируемую различными ферментами, называют нитроредуктазной, а отсюда активность органа или ткани также нитроредуктазной активностью.

8.2.1. ВОССТАНОВЛЕНИЕ НИТРОСОЕДИНЕНИЙ

Ароматические нитросоединения превращаются в различных органах и тканях экспериментальных животных в соответствующие амины. Ферментная активность нитроредуктаз отмечена в микросомной и растворимой фракциях клеток и зависит от наличия в среде НАДН и НАДФН. Ферментная система малоспецифична по отношению к субстрату, ингибируется кислородом и активируется флавиновыми ферментами.

Следовательно, в клетке имеются нитроредуктазы цитозольные и мембранносвязанные, т. е. локализованные в эндоплазматическом ретикулуме. К цитозольным, как уже указывалось ранее, относятся ксантиноксидаза и альдегидоксидаза.

Ксантиноксидаза катализирует восстановление нитрогруппы производных нитрофурана, 5-нитротиадизола, 2,4-динитрофенола, 2,4,6-тринитрофенола, но не восстанавливает *n*-нитрофенол, *n*-нитробензоат и хлорамфеникол. При восстановлении большинства соединений образуются соответствующие гидроксиламины, однако при восстановлении 2,4-динитрофенола — 2,4-диаминофенол.

Нитровосстановление ксантиноксидазой проходит в анаэробных условиях, является СО-нечувствительным, зависит от гипоксантина, НАДН, НАДФН, ингибируется аллопуринолом,

аденином, азогуанидином и азоксантином [250]. Оптимальным значением рН для НАДФН-зависимой ксантиноксидазы является 8,1, а для НАДН-зависимой — 7,0.

Восстановление ароматических нитросоединений этим ферментом зависит от электронных свойств и положения заместителя, при этом наблюдается корреляция σ -констант Гаммета *n*-заместителя. В связи с чем скорости нитровосстановления субстратов были выше для электроноакцепторных заместителей. Следует также отметить, что *о*-, *м*-, *п*-изомеры нитросоединений восстанавливаются со скоростями, большими для *п*-изомеров в случае электроноакцепторных заместителей и *м*-изомеров для электронодонорных. Во всех случаях *о*-замещенные нитробензолы восстанавливаются с меньшими скоростями, вероятно из-за стерических факторов.

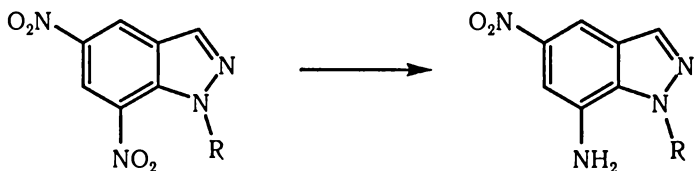
Выбор ксантиноксидазы участвовать в дегидрогеназном или редуктазном катализе может быть определен соотношением окислительно-восстановительных потенциалов субстрата и фермента. Например, для нитрофурановых производных потенциал одноэлектронного восстановления при рН 7,0 составляет от 220 до 270 мв. У ксантиноксидазы максимальным сродством к электрону обладает ФАДН, для соотношения ФАДН/ФАДН₂ окислительно-восстановительный потенциал ксантиноксидазы печени цыпленка равен 377 мв. Отсюда возможность нитрофурановых соединений служить акцептором при окислении ксантина, но не восстанавливать 5-нитроимидазолы (соответствующие потенциалы: 486 и 610 мв).

Альдегидоксидаза катализирует восстановление нитрофуразона, 1,3-диметил-5-нитроурацила, 2-амино- и 2-бром-5-нитроанизолов до соответствующих гидроксиламинов. Фермент в тоже время не восстанавливает *п*-нитробензойную кислоту, *п*-нитрофенол, *п*-нитроанизол и 1-нитронафталин [251]. Нитровосстановление ферментом проходит в анаэробных условиях, но он менее чувствителен к кислороду по сравнению с ксантиноксидазой и не требует НАДН и НАДФН. Ингибируют реакции нитровосстановления цианид, менадион, хлорпромазин,

n-хлормеркурибензоат, а аллопуринол и дикумарол не проявляют такой активности.

ДТ-диафораза (НАДН или НАДФН дегидрогеназа, использующая в качестве акцептора электронов хинон) локализуется в цитозоле клеток и катализирует реакции восстановления *n*-нитробензойной кислоты, 2-нитронафталина и его аналогов, но не 4-нитрохинолина [252]. Активность фермента ингибируется дикумаролом и кислородом, но в меньшей степени, чем ксантиноксидаза. Фермент является гомодимерным белком, субъединица которого составляет 27 кД.

К мембраносвязанным ферментам, участвующими в процессах восстановления нитросоединений относятся НАДФН-цитохром *с* редуктаза и/или СYP450. Имеющиеся в литературе данные позволяют отметить ряд особенностей микросомального нитровосстановления. Во-первых, для этой системы характерна широкая субстратная специфичность (нитробензойная кислота, хлорамфеникол, параоксон, паратион и нитразепам, образующие в качестве продуктов реакции первичные амины). Предполагается, что участвует в этом процессе СYP450 [84]. Если в качестве субстрата используется пиридазол, то он в нитроредуктазном катализе образует производное гидроксиламина [20]. По-видимому, эту реакцию катализирует НАДФН-цитохром *с* редуктаза. Во-вторых, при восстановлении динитропроизводных удалось обнаружить в молекулах, предпочтительно восстанавливаемые участки. Так в случае 5,7-динитроиндазола (XVIII) наблюдается специфическое восстановление нитрогруппы только в положении 7 [253]:

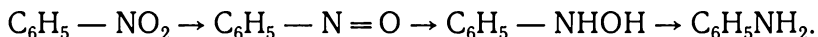


R = H (XVIII), CH₃ (XIX)

Если в качестве субстрата используется XIX, то избирательного действия нитроредуктаз не наблюдается. Очевидно, структурная избирательность проявляется в том случае, когда одна из нитрогрупп способна образовывать внутримолекулярную водородную связь. Причина такого явления не ясна. Предполагается, что реализация наблюдаемой избирательности осуществляется не прямым способом, а косвенным, например, посредством стабилизации водородной связью промежуточных соединений, образующихся в процессе восстановления [254].

В целом для микросомального нитровосстановления существуют на первый взгляд некоторые противоречия. С одной стороны, для проявления ферментативной активности нитроредуктазы используется цитохром Р450, а с другой — ингибируется кислородом. Для объяснения кажущихся противоречий приведем некоторые точки зрения на механизм восстановления нитросоединений.

Начальная стадия восстановления субстратов, по-видимому, связана с транспортом двух электронов от флавопротеида, в результате чего образуются в качестве промежуточных соединений нитрозопроизводные и гидроксилламин [255]:

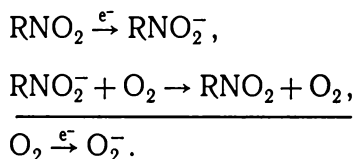


Однако предпочтение отдается радикальному механизму. В частности, Мейсон и Хольтцман [256] наблюдали характерный спектр нитробензольного анионного радикала при инкубации субстрата в анаэробной среде, содержащей электронодонорные кофакторы и микросомы печени или флавиновую модельную систему. В этом случае окись углерода ингибирует восстановление субстрата, но не влияет на процесс образования дианионных радикалов. По мнению авторов, цитохром Р450 обязательно участвует в нитроредуктазных реакциях, но вступает в процесс на более поздних этапах, т. е. передает электроны промежуточным соединениям, которые образуются вслед за анионными радикалами. Не исключено, что нитроредуктаза имеет много общего с альдегидоксидазой, ксантинооксидазой

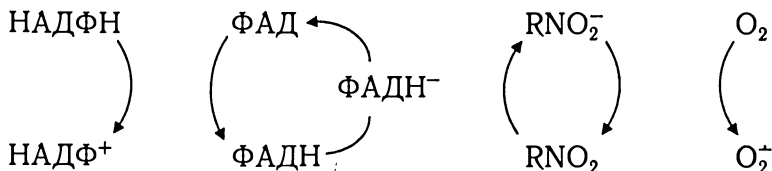
и НАДФН-цитохром с редуктазой, которые восстанавливают субстраты через свободные радикалы до гидроксиламинов.

До сих пор не ясно, почему кислород ингибирует восстановление нитросоединений. Одни авторы [257] предполагают, что кислород в нитроредуктазных реакциях конкурирует с нитрозосоединениями за восстанавливающие эквиваленты. Вероятно, фермент восстанавливает нитросоединения до гидроксиламина. Последний может вновь окисляться до нитрозосоединений с последующим образованием исходного вещества. Обе точки зрения высказаны на основании исследования механизмов восстановления нитротиазола и пиридазола. В частности обнаружено, что добавление субстратов к НАДФН-цитохром с редуктазе приводит к заметному усилению окисления НАДФН, однако нитрогруппа субстратов не восстанавливается.

Другие авторы [256] считают, что ингибирование возникает в результате взаимодействия кислорода с нитроароматическими радикалами с возникновением пергидроксильных анионных радикалов и ароматических нитросоединений. Следовательно, ингибирование нитроредуктаз кислородом может быть результатом быстрого переокисления нитроароматического анионного радикала в следующей последовательности:



Предложена [256] схема восстановления нитросоединений в аэробных условиях с одновременным образованием пергидроксильного анионного радикала:



Из схемы видно, что образование пергидроксильного радикала включает одноэлектронное восстановление нитросоединения восстановленными флавопротеидами.

Представленный механизм подтвердился в опытах с использованием методов ЭПР и полярографии [258]. В спектрах ЭПР нитрофурантоина и *n*-нитробензоата не зарегистрировано.

Таким образом, имеющиеся представления о механизме восстановления нитросоединений можно представить на рис. 8.5.

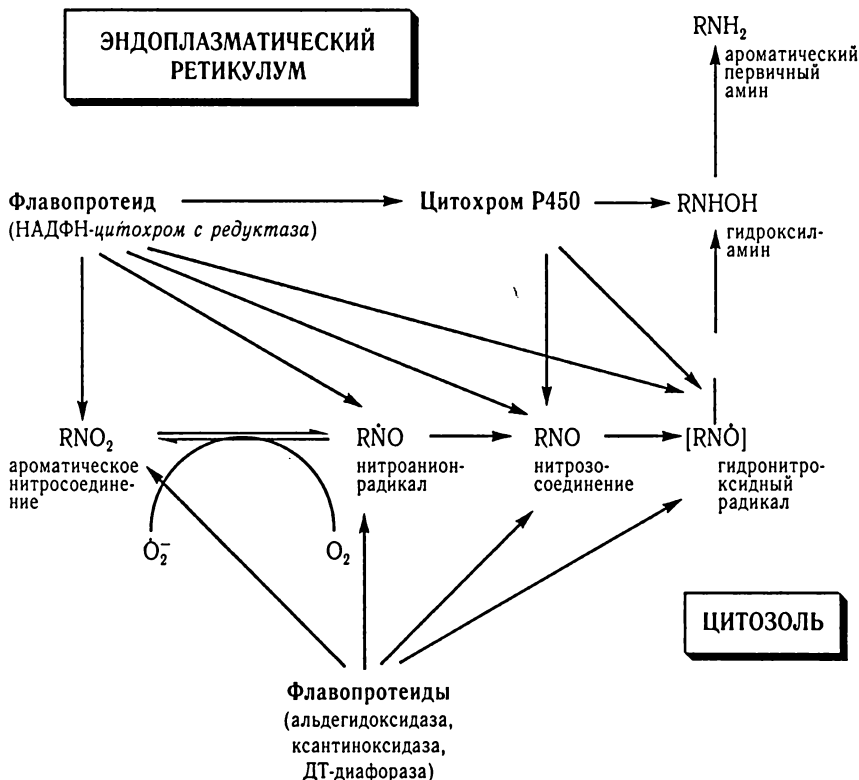


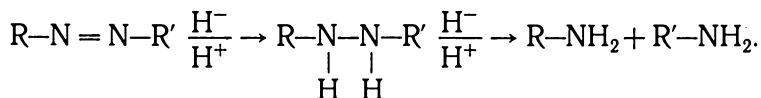
Рис. 8.5. Основные ферментные системы, участвующие в ароматическом нитровосстановлении печени (квадратные скобки у нитроксида указывают на меньшую вероятность существования такого интермедиата)

Следует отметить, что эта схема не отражает всех реальных возможностей при восстановлении различных нитросоединений. Например, нифедипин при инкубации с микросомами печени крыс и НАДФН в анаэробных условиях не образуют нитроанион-радикалов.

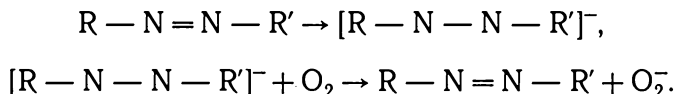
Ароматические нитросоединения могут восстанавливаться также ферментами слизистой оболочки кишечника и микрофлорой [84, 259]. Нитроредуктазы микроорганизмов, в частности *Escherichia coli*, отличаются от тканевых тем, что ингибируются не кислородом, а хлортетрациклином. Индуцируют их цистеин и ион Mn^{2+} . Что касается конечного превращения гидроксилamina восстановительным путем до соответствующих аминов (рис. 8.5), то по некоторым соображениям оно может катализироваться N-гидроксиламинредуктазой. В качестве кофактора в ферментативной реакции используется НАДН и НАДФН. Предполагается, что для проявления N-гидроксиламинредуктазной активности обязательными компонентами должны быть цитохром b_5 и НАДФН-цитохром b_5 редуктаза. Возможно наличие и третьего компонента, а отсутствие полос его поглощения в видимой области спектра указывает на то, что он не содержит иона металла.

8.2.2. ВОССТАНОВЛЕНИЕ АЗОСОЕДИНЕНИЙ

Различные азокрасители, которые поступают в организм в виде ароматических аминов, подвергаются восстановлению, которое катализируется микросомной азоредуктазой. Восстановление азосоединений включает две стадии — восстановление субстратов до гидразосоединений и их восстановительное расщепление:



На примере сульфоназо III показано, что процесс восстановления азосоединений может включать образование свободных радикалов [260]. Этот процесс, как в случае восстановления нитросоединений, ингибируется кислородом вследствие быстрого переокисления азоанионного радикала:



Азосоединения в микросомах могут восстанавливаться НАДФН-цитохром *с редуктазой* [261]. Однако доказано, что в процессе активное участие принимают НАДФН-цитохром *b₅* редуктаза, цитохром P450 и флавины [262]. Флавины, как известно, катализируют восстановление хинонов до семихинонов, а также нитроароматических веществ до анионных радикалов. Скорость восстановления азосоединений флавинами пропорциональна потенциалу восстановления, что свидетельствует о простом переносе электронов в ходе реакции. В этой связи Мейсон и соавторы [260] полагают, что НАДФН-цитохром *с редуктаза* передает электроны на субстрат посредством флавинов, которые полностью или наполовину восстановлены цитохромом *с*.

В отличие от микросомальных азоредуктаз, ферменты, находящиеся в растворимой фракции, не теряют своей активности в присутствии кислорода. В качестве доноров электронов они, как правило, используют НАДН и НАДФН. Наиболее вероятными нитроредуктазами цитозоля клеток являются ДТ-диафораза [263] и ксантиноксидаза [250].

Целый ряд арилазосоединений как водорастворимых, так и гидрофобных, подвергаются восстановительному расщеплению микрофлорой желудочно-кишечного тракта экспериментальных животных и человека [264]. Наибольшая активность ферментов микроорганизмов проявляется в том случае, когда среда находится в анаэробных условиях и используются ФМН и ФАД.

8.2.3. ВОССТАНОВЛЕНИЕ N-ОКИСЕЙ

Химическим путем N-окиси легко восстанавливаются до соответствующих аминов. Первые исследования этой реакции в организме животных проведены на алкалоидах. Показано, что их N-окиси не подвергаются восстановлению. Позже выяснилось, что все же N-окиси восстанавливаются в опытах *in vitro* и *in vivo*, но с малым выходом соответствующего третичного амина [265]. Однако оказалось, что гомогенаты органов животных, восстанавливающие N-окиси, устойчивы к нагреванию и осуществляют процесс в присутствии ионов железа, цистеина или восстановленного глутатиона, а также гемоглобина, метгемоглобина или эритроцитов [266]. Аналогичный эффект может быть достигнут при использовании микросом печени без добавления НАДФН [267].

Ферменты, катализирующие восстановление N-окисей, в литературе получили название N-оксидредуктаз. Наибольшая их ферментативная активность определяется в печени, несколько меньше в почках, кишечнике, легких и сердце [268]. В печени N-оксидредуктазная активность обнаруживается в цитозоле (ксантиноксидаза), микросомах (НАДФН-цитохром с редуктаза и CYP450) и митохондриях.

Редуктазная активность ксантиноксидазы ингибируется цианидом и частично кислородом [250]. Если в качестве субстрата используется N-окись [^{18}O]-никотинамида, то наблюдается прямой перенос кислорода от субстрата на ксантин. Активность микросомной N-оксидредуктазы ингибируется окисью углерода, октиламином и кислородом. Интересная особенность наблюдается при внесении в инкубационную среду, содержащую микросомы, N-окиси тирамида. В этом случае происходят связывание субстрата лишь с восстановленной формой цитохрома P450 и его конкуренция с окисью углерода [269]. По-видимому, N-окись при взаимодействии с восстановленным цитохромом P450 выступает в качестве шестого лиганда гемового железа.

Скорость восстановления субстрата стимулируется в 20 и 100 раз ФМН и метилвиологеном соответственно, но кислород препятствует такому стимулирующему действию. На основании этого сделано предположение [250, 270] о том, что ФМН и метилвиологен, будучи восстановленными НАДФН-цитохром *с редуктазой*, в свою очередь восстанавливают цитохром P450. И наконец, последний катализирует превращение N-окиси в амин. Лимитирующей при ферментативном восстановлении N-окисей является стадия восстановления цитохрома P450 [258, 259].

В заключение рассмотрим некоторые свойства *митохондриальной N-оксидредуктазы*. Активность фермента усиливается при замене в инкубационной среде НАДН на его генерирующую систему. В аэробных условиях редуктазная активность уменьшается более чем на 85 %. Фенобарбитал не индуцирует, а метирапон и октиламин не ингибируют этот фермент. Митохондриальная N-оксидредуктаза с неодинаковой скоростью восстанавливает различные по физико-химическим свойствам субстраты [250, 270].

В митохондриях печени существуют две разновидности N-оксидредуктазы: одна — сукцинатзависимая, которая ингибируется окисью углерода, антимицином, ротеноном и цианидом, другая — НАДФН-зависимая. Ингибитором последней служит только окись углерода [269]. Обработка митохондрий дигитонином позволила заключить, что N-оксидредуктаза располагается на внутренней мембране. На долю микросом и митохондрий приходится 66—70 % и 11—12 % соответственно всей клеточной активности.

Бактериальные редуктазы восстанавливают N-окись триметиламина в триметиламин [270]. Интересно отметить, что хлорпромазин-5-оксид этой же системой может восстанавливаться до соответствующего сульфида. В этом случае речь идет об восстановлении S-окисей [250].

8.2.4. ВОССТАНОВЛЕНИЕ НИТРОЗОСОЕДИНЕНИЙ

Изучен процесс восстановления нитрозосоединений в микросомах печени экспериментальных животных; в качестве субстрата применялся 1-нитрозоадамantan. Инкубация его в среде, содержащей отмытые микросомы печени кролика, НАДФН-генерирующую систему и кислород, приводила к получению соответствующего гидроксилamina. Продукт реакции выделен тонкослойной и газо-жидкостной хроматографией и идентифицирован с помощью масс-спектрометрического метода. Скорость формирования в микросомах животных гидроксилamina зависела от содержания белка в инкубационной среде. Субстрат не восстанавливался, если в среде отсутствовала НАДФН-генерирующая система или микросомы.

Нитрозоредуктазная активность наиболее развита в печени кролика и в четыре-пять раз ниже в легких, кишечнике и почках. Этот фермент имеет и видовые особенности.

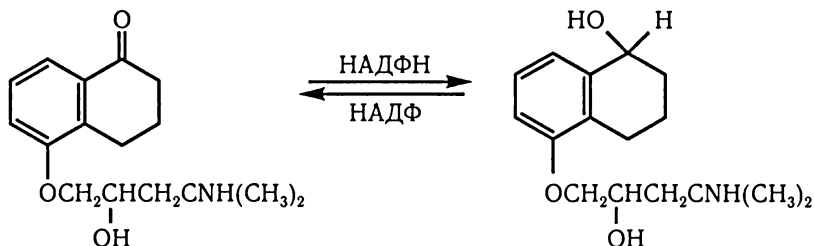
Нитрозоредуктаза выделена из микроорганизмов, в частности из *E.coli* использует в качестве кофакторов НАДН и НАДФН и ее активность ингибируется дикумаролом (ингибитор ДТ-диафоразы). Молекулярная масса фермента составляет 24 кД [271].

Способность нитрозоредуктазы восстанавливать нитрозосоединения до соответствующих гидроксилaminов используется фармакологами для создания специфических пролекарств, метаболиты которых имеют ярко выраженную противоопухолевую активность.

8.2.5. ВОССТАНОВЛЕНИЕ КЕТОНОВ

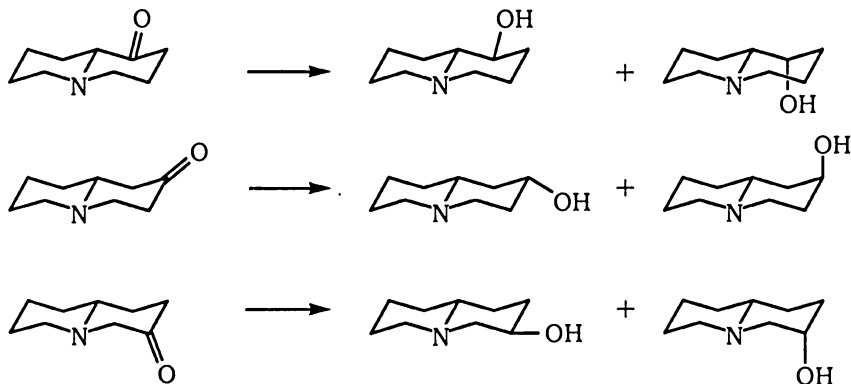
Существуют редуктазы, восстанавливающие карбонильные группы в молекулах кетонов и альдегидов. Некоторые из них по химической природе являются оксидредуктазами, которые

окисляют спирты. Подбирая соответствующие субстраты и коферменты, можно показать, что реакция между спиртом и кетоном обратима, например:



Фермент локализован в растворимой фракции клеток [272]. В качестве кофактора чаще всего служит НАДФН. Восстановление бунолола происходит в присутствии кислорода, а также в его отсутствие. Оптимум рН фермента, катализирующего превращение бунолола в спирт, ниже, чем для фермента, обеспечивающего обратную реакцию.

Частично очищенная редуктаза растворимой фракции гепатоцитов крыс восстанавливает 1-, 2- и 3-оксохинолизидины:



Соотношение образовавшихся изомеров с экваториальной и аксиальной оксигруппами составляет 2:1. Фермент, катализирующий процесс, по физико-химическим свойствам отличается от алкогольдегидрогеназы [273].

Ациклические кетоны восстанавливаются ферментами, которые расположены в растворимой и микросомной фракциях клеток. При изучении [274] восстановления 2-(2-амино-5-бромбензоил) пиридина и структуры фермента его катализирующего установлено, что он является мембраносвязанным. В то же время некоторая активность фермента обнаружена и в растворимой фракции. Такая кетонредуктаза находится в микросомах и растворимой фракциях гепатоцитов кролика и морской свинки в микросомах печени крыс. Оптимальная активность цитоплазматического фермента проявляется при pH 7,2—7,8, а микросомного — при pH 0,5. Замена НАДФН на НАДН в инкубационной среде приводит к исчезновению редуктазной активности микросом.

Исследование метаболизма оксима ацетофенона гомогенатами печени крыс показало, что субстрат устойчив к окислительным и гидролитическим процессам. Однако в анаэробных условиях способен восстанавливаться. Оксимредуктаза, катализирующая данный процесс, локализована в микросомах и растворимой фракции печени. Микросомальный фермент по своей природе НАДФН-зависимый. Для проявления его активности цитохром P450 не нужен. Для фермента, находящегося в растворимой фракции, необходим НАДФН [84].

Отметим еще два момента, касающиеся восстановления кетонов. Если оксим ацетофенона и 2-(2-амино-5-бромбензоил) пиридин следует относить к субстратам кеторедуктаз, то весьма близкий по структуре 5-бром-2-аминобензофенон не является таковым [240]. Кроме того, взаимное ферментативное превращение кетонов и спиртов интересно с точки зрения их стереохимии. Эти аспекты рассмотрены нами в соответствующих публикациях [19, 20].

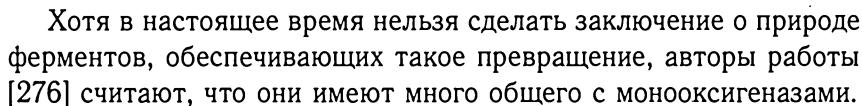
Кетогруппа *n*-цинерулозы, входящая в состав молекулы антибиотика аклациномицина, восстанавливается НАДН-зависимым ферментом, локализованным лишь в микросомальной фракции.

8.2.6. ВОССТАНОВЛЕНИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ ЭПОКСИДОВ

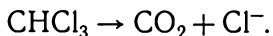
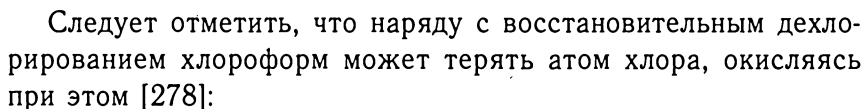
В организме экспериментальных животных и человека происходит не только эпоксидирование ароматических соединений, но и обратная реакция, т. е. восстановление эпоксидов. Такое явление продемонстрировано на примере эпоксидов полициклических углеводородов, содержащих К-область (бенз[а]антрацен, бенз[а]пирен, 3-метилхолантрен), и тех, у которых она отсутствует (бенз[а]антрацен-8,9-оксид). Фермент, катализирующий процесс восстановления ароматических эпоксидов, назван эпоксидредуктазой. Для проявления ее каталитической активности необходим НАДФН, тогда как молекулярный кислород ингибирует реакцию. Механизм, по которому протекает реакция, неизвестен. Вероятно, он включает прямое отщепление кислорода от молекулы эпоксида. Внесение в среду ингибиторов эпоксидгидролазы повышает выход исходного углеводорода, что свидетельствует о конкуренции между восстановлением эпоксидов и их дальнейшем превращении в диолы. На основании полученных данных сделано заключение [275], что окислительно-восстановительная система, катализирующая превращение исходных углеводородов и эпоксидных метаболитов, находится в эндоплазматическом ретикулуме печени и обеспечивается цитохром Р450-зависимыми ферментами.

Эпоксидредуктаза не катализирует реакции восстановления полициклических углеводородов, у которых оксирановое кольцо образовано циклоалкеновым. К таким субстратам относятся 9,10-дигидробенз[а]пирен-7,8-оксид и 7,8-дигидробенз[а]пирен-9,10-оксид.

В отличие от процессов восстановления оксидов полициклических углеводородов, которые направлены на образование исходных веществ, восстановление оксиранового кольца скополамина сопровождается выделением соответствующего спирта:

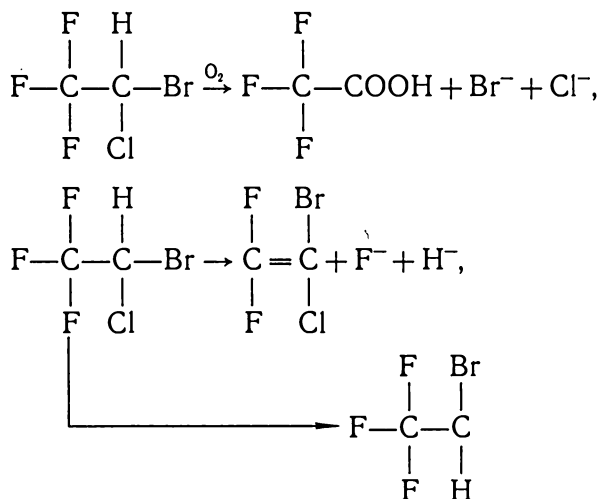


В микросомах печени содержится фермент, который в присутствии НАДФН и молекулярного кислорода удаляет галоген из его алифатической части с одновременным восстановлением субстрата. Так, хлороформ восстанавливается следующим образом [277]:


$$\begin{array}{ccccccc} & & & \text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH} & & \text{CO}_2 & \\ & & \text{OH} & \downarrow & & \downarrow & \\ \text{CF}_3\text{CHBrCl} & \rightarrow & [\text{CF}_3\text{CHCl}] & \rightarrow & [\text{CF}_3\text{CH}] & \rightarrow & \text{CF}_3\text{COOH} \\ & & \parallel & & \parallel & & \downarrow \\ & & \text{O} & & \text{O} & & \text{CF}_3\text{COO}^- \\ & & [\text{CF}_3\text{CH}] & & & & \downarrow \\ & & \swarrow & & & & \text{CF}_3\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH} \\ & & \text{O} & & & & \\ & & \parallel & & & & \end{array}$$

Долгое время считалось, что связь фтор—углерод не разрывается в процессе метаболизма. Однако обнаружение в качестве метаболита галотана N-ацетил-S-(2-бром-2-хлор-1,1-дифторэтил)-L-цистеина [279] заставило пересмотреть такое представление.

Последние данные указывают, что метаболизм галотана условно делится на два пути. Первый включает окисление молекулы с образованием трифторуксусной кислоты и отщепление галогенов, второй — восстановительное дегалогенирование, в результате чего элиминирует атом фтора:

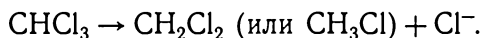


Вероятно, обе реакции протекают в микросомах и зависят от цитохрома P450, так как для них необходимы НАДФН и цитохром P450. Более того, они индуцируются фенобарбиталом и бифенилами.

На примере метаболизма метоксифлорана предложено два пути восстановительного дегалогенирования [280]. Первый начинается O-деметилированием, второй — дехлорированием; на некоторых этапах происходит и элиминирование атома фтора. Восстановительное дефторирование наблюдается при

метаболизме и других анестетиков, в частности фторэксена ($\text{CF}_3\text{—CH}_2\text{—O—CH}_2\text{=CH}_2$) и энфторана ($\text{HCF}_2\text{—O—CClH—CF}_3$).

В микросомах печени животных локализован фермент, который в присутствии НАДФН и молекулярного кислорода с одновременным восстановлением субстрата удаляет галоген из алифатической части [281]:



Известны и другие процессы восстановления субстратов: восстановление дисульфидов, сульфоксидов, восстановительное дегидроксилирование гидроксамовых кислот и катехолов [20]. Природа и локализация ферментов, катализирующих большинство указанных типов реакций, неизвестны.

8.2.8. ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПИРИМИДИНОВ

В организме животных и человека метаболизм пиримидинов (урацила и тимина) начинается реакциями восстановления, приводящими к дигидроурацилу и дигидротимину. Катализирует процесс дигидропиримидингидрогеназа (DPD). В том случае когда лекарственное средство является производным пиримидина, например, 5-фторурацил, оно также подвергается восстановлению. Локализуется DPD в цитоплазме гепатоцитов, моноцитов, лимфоцитов и тромбоцитов, но не в эритроцитах [282]. Количество аминокислотных остатков, входящих в состав фермента составляет 1025, его молекулярная масса 111 кД, а ген, кодирующий его, находится в 1-й хромосоме (локус 1p22).

В некоторых случаях наблюдается [283] осложнение терапии 5-фторурацилом, причиной которого является наследственная низкая активность DPD. Она наследуется по аутосомному рецессивному типу [283]. Такое явление характеризуется удлиненным периодом полувыведения препарата (159 мин), в норме этот показатель равен 8—22 мин. Более того, в плазме, моче

и ликворе пациентов не были обнаружены метаболиты этого препарата. Отмечена [284] также четкая корреляция: чем ниже активность DPD, тем тяжелее побочные эффекты 5-фторурацила. Преобладающим токсическим эффектом препарата была нейротоксичность и реже кардиотоксичность.

Генетические исследования [285] последних лет, проводимые с помощью ПЦР, позволили выявить ряд мутаций гена DPD, ответственных за системную активность фермента, а следовательно за повышенную чувствительность к 5-фторурацилу. Наиболее распространенными мутациями является делеция в 165 положении, инверсия гуанина на аденин в 14 положении, а также сочетание двух этих мутаций. Другие мутации гена DPD (соответствующие замены Asp974Ala, Cys29Arg, Arg886His, а также делеции в 296 и 1897 положениях) встречаются гораздо реже.

Обследование 21 200 японцев показало [286] наличие только двух человек, являющихся гомозиготами по мутантным аллелям гена DPD. Авторы заключили, что распространенность гомозигот по мутантным аллелям гена фермента составляет один на тысячу населения. По данным этих же авторов, повышенная чувствительность к 5-фторурацилу отмечается не только у гомозигот, но и гетерозигот по мутантным аллелям гена DPD.

8.3. ГИДРОЛИЗ

Гидролитическое расщепление лекарственных средств, катализируется ферментами, способными к разрыву соответствующих связей. Они гидролизуют очень большое число соединений и исходя из правил классической биохимии их относят к классу гидролаз. Ферменты этого класса действуют на простые эфирные связи (эпоксидгидролаза), сложноэфирные связи (эстеразы), на C—N-связи, отличающиеся от пептидных связей (амидазы), гликозильные соединения (β -глюкуронидаза).

8.3.1. ЭСТЕРАЗЫ

В эту подгруппу включены несколько ферментов, обладающих сравнительно широкой специфичностью. Они, катализируя разрыв эфирных связей, гидролизуют очень большое число различных сложных эфиров, хотя и не с одинаковой скоростью. Некоторые из них в известной мере действуют также и на лактоны. Ряд ферментов представлены в определенной ткани множественными формами, незначительно отличающимися по специфичности, а у соответствующих ферментов из различных видов экспериментальных животных часто наблюдаются различия в специфичности. Имеются также перекрывания в специфичности с некоторыми ферментами, относящимися к другим группам. Так 4-нитрофенилацетат, широко используемый для обнаружения эстеразной активности, гидролизуются также более специфичными эстеразами, например ацетилхолинэстеразой, и протеолитическими ферментами, например химотрипсином.

Простые эстеразы катализируют гидролиз незаряженных субстратов; они специфичны главным образом в отношении длины и формы углеводородных цепей по обе стороны от эфирной связи. Другие эстеразы различаются на основе таких критериев, как способность гидролизовать ароматические эфиры или способность ингибироваться фосфорорганическими соединениями [287]. Так, карбоксилэстеразы гидролизуют как ароматические, так и алифатические эфиры и ингибируются DFP; арилэстеразы слабо действуют на алифатические эфиры и не ингибируются DFP.

Эфиры карбоновых кислот и арилэфиры также гидролизуются в организмах животных и человека эстеразами. Альдريدж [288] классифицировал эстеразы как *A* и *B*. Эстераза *A* со значительно большей скоростью гидролизует *n*-нитрофенилацетат, чем эфир бутирата, и не ингибируется параоксоном. Эстераза *B* ингибируется параоксоном (10^{-7} — 10^{-8} моль/л) и гидролизует

n-нитрофенилбутират быстрее, чем ацетат. Кроме того, эстераза А гидролизует параоксон до диэтилфосфорной кислоты и *n*-нитрофенола [289]. На основании этих данных эстераза А называется арилэстеразой или параоксоназой (PON), а эстераза В-карбоксилэстеразой, метилбутиразой, монобутиразой.

Арилэстераза в большей степени локализована в органах и тканях животных и в меньшей — в плазме крови. Фермент, выделенный из плазмы крови овцы и очищенный в 385 раз, имеет молекулярную массу 35—50 кД [290]. Для параоксона константа Михаэлиса эстеразы равна 4,2 ммоль/л (для сыворотки крови $K_m = 0,2$ ммоль/л). Очевидно, в процессе очистки разрушается фактор, активирующий в нативном состоянии фермент. Очищенный фермент ингибируется на 50 % 0,63 мМ раствором Ba^{2+} и 0,2 мМ раствором ЭДТА [291].

По активности различные формы арилэстеразы отличаются друг от друга в зависимости от величины pH, чувствительности к ионам и местом локализации. В растворимой, микросомной и митохондриальной фракциях гепатоцитов крыс общая ферментативная активность к параоксону составляла 71:34:7 при pH 8,8 и 22:49:8 при pH 7,7. В плазме крови человека [292] и кролика [293] обнаружены разновидности ферментов, катализирующих различные субстраты при строго определенных значениях pH.

Кроме параоксона, параоксоназа инактивирует такие ксенобиотики как фосфоорганические соединения, органофосфаты, карбаматы, эфиры уксусной кислоты. Эти соединения широко применяются в сельском хозяйстве и промышленности, используются в качестве лекарственных средств (антихолинэстеразные препараты — параоксон, армин), а некоторые из них являются боевыми отравляющими веществами (зарин, заман, табун).

Выделено три изофермента параоксоназы: PON1, PON2 и PON3. Наибольшее значение в метаболизме ксенобиотиков принадлежит PON1. В настоящее время известна аминокислотная последовательность и количество аминокислотных остатков (354), входящих в состав PON1. Молекулярная масса фермента составляет 39 кД. Идентифицирован ген, кодирующий PON1,

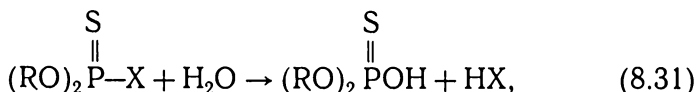
находящийся в седьмой хромосоме человека, локусе 7q21.3. Локализуется фермент в основном в плазме крови и связан с липопротеинами высокой плотности.

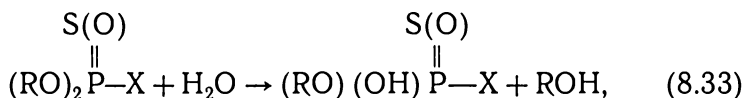
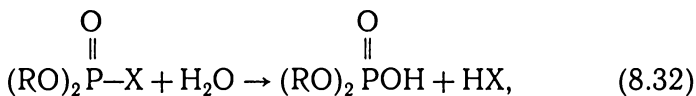
В 90-е годы прошлого века были идентифицированы [294] мутации, приводящие к генетическому полиморфизму PON1. Наиболее распространенной мутацией, обуславливающей изменение активности фермента, является замена в 192 положении глутамина на аргинин (Gln192Arg), которая наследуется по аутосомному рецессивному типу.

У гомозигот по мутации Gln192Arg активность PON1 (субстрат параоксон) значительно выше, чем в группе без мутации, в отношении других субстратов (хлопирфос, диазинон, зарин, заман) активность фермента у гомозигот по этой же мутации ниже чем у лиц не имеющих ее. Таким образом, авторы [294] делают вывод о том, что носители этой мутации, особенно гомозиготные пациенты, более чувствительны к фосфорорганическим соединениям. Распространенность гомозигот по мутации Gln192Arg среди испанского населения составляет 16 %, среди североевропейцев — 9 %, а среди японцев — 41,4 % [295]. Именно это обстоятельство послужило причиной значительных жертв при применении зарина во время террористического акта в токийском метро в марте 1995 года.

Следует отметить антиатерогенную роль PON1. Находясь в участках с липопротеинами высокой плотности, фермент инактивирует окисленные липиды. Экспериментным подтверждением этого факта явилась работа [297], в которой было показано, что у мышей, лишенных гена PON1 на фоне гиперхолестериновой диеты быстрее развивался атеросклероз сосудов, чем у животных имеющих этот ген.

В целом фосфорорганические вещества гидролизуются с помощью ферментов, атакующих эфирные связи или действующих на ангидриды кислот по трем типам:





где R — алкильная, а X — элиминирующая группы (алкокси, арилокси и др.). В результате реакций 8.31 и 8.32 образуются диалкилфосфорнотионовая и диалкилфосфорная кислоты соответственно, а для 8.33 — деалкильное производное (спирт).

Карбоксилэстеразы образуют ряд ферментов, катализирующих реакции гидролиза ароматических и алифатических эфиров. Они отличаются от липаз тем, что гидролизуют водорастворимые субстраты, в то время как последние действуют на границе раздела фаз вода/эфир и расщепляют преимущественно внешние эфирные связи.

Влияние изменений в ацильной и алкильной частях молекулы субстрата на активность карбоксилэстеразы до некоторой степени различно. С удлинением ацильной части молекулы сродство и реакционная способность сначала увеличивается параллельно, вплоть до цепи с 4—5 углеродными атомами, но дальнейшее увеличение длины цепи вызывает уменьшение реакционной способности, хотя сродство продолжает быстро возрастать (по крайней мере до 10 углеродных атомов).

При удлинении алкильной цепи до 4—6 углеродных атомов также наблюдается параллельный рост сродства и реакционной способности; однако дальнейшее увеличение длины цепи вызывает снижение обоих показателей. У эфиров с относительно короткими цепями алкильная группа оказывает гораздо большее влияние на сродство, чем ацильная группа, тогда как для реакционной способности характерны обратные соотношения. С повышением степени разветвленности цепи резко возрастает сродство и несколько снижается реакционная способность.

У предпочтительных субстратов на обоих концах молекулы находятся неполярные группы. Фениловые и нитрофениловые эфиры являются хорошими субстратами. Гидролизуются также некоторые циклические соединения, такие, как бутиролактон и оксазолины. Представленные данные послужили основанием для прогнозирования строения активного центра карбоксиэстеразы [287].

Очищенная карбоксилэстераза кишечника человека с высокой скоростью гидролизует аспирин [297], а фермент плазмы крови кролика, свободный от арилэстеразы и холинэстеразы катализирует расщепление кокаина [298]. Гидролиз прокаина и аналогичных местных анестетиков был предметом обсуждения в обзорной статье [299]. Показано, что те вещества, которые слабо или вообще не подвержены гидролитическому расщеплению, например мепивакаин, в общем более токсичны, чем быстро гидролизующиеся. Такое заключение послужило основанием для выделения в отдельный фермент разновидности карбоксилэстеразы. Его назвали «*атропинэстеразой*». Отсутствие этого фермента в организме некоторых кроликов приводит к появлению судорог у животных после введения им прокаина [300].

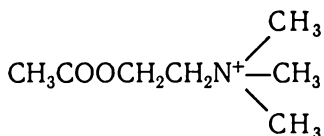
Карбоксилэстераза — чрезвычайно важный фермент, участвующий в метаболизме многочисленных фосфорорганических инсектицидов. Наибольшая информация получена для фермента, катализирующего гидролитическое расщепление малатиона, продуктом которого является соответствующая монокарбоновая кислота [301]. Он обнаружен в печени, почках, легких, селезенке, плазме крови крыс, мышей, морских свинок, собак и человека. Активность фермента ингибируется аналогами паратиона — хлортионом, диазиноном, систоном и фоздрином.

Определенный вклад среди эстераз в общий процесс метаболизма соответствующих лекарственных средств вносит и *холинэстераза*. Ферменты, гидролизующие эфиры холина, относятся к группе сериновых ферментов, сильно ингибируемых DFP и алкалоидом эзеринном. Хотя эти ферменты были предметом

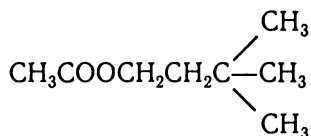
интенсивного исследования, только небольшое их число получено в высокоочищенном состоянии. Еще в начале 40-х годов прошлого столетия было высказано предположение [287] о том, что существуют два основных типа этих ферментов, названных «истинными холинэстеразами» и «псевдохолинэстеразами». Они существенно различаются по кинетическим и другим свойствам, а также имеют большие различия в специфичности, хотя как те, так и другие гидролизуют ацетилхолин. С целью типирования этих двух типов холинэстераз используют маркерные субстраты — бензоилхолин, бутирилхолин, ацетил- β -метилхолин.

Весьма детальные исследования специфичности рассматриваемых ферментов проведены на примере специфичности *ацетилхолинэстеразы* из эритроцитов и плазмы человека. Хотя были использованы лишь частично очищенные препараты ферментов, удалось, однако, показать, что каждый из ферментов гидролизует как холиновые, так и нехолиновые эфиры. Варьируя длину ацильной цепи, присоединенной к холину, показано, что скорость расщепления эфиров холина под действием ацетилхолинэстеразы резко уменьшается с увеличением длины цепи: бутирилхолин гидролизуетс^я со скоростью равной только 1—2 % скорости ацетилхолина. С холинэстеразой дело обстояло как раз наоборот — в этом случае бутирилхолин гидролизовался вдвое быстрее, чем ацетилхолин. Изменение длины ацильной и алкильной цепей также влияло на скорость гидролиза нехолиновых алифатических эфиров, катализируемого ацетилхолинэстеразой и холинэстеразой. При изменении длины алкильной цепи (ацильная часть — ацетат) влияние было в общем сходным для обоих ферментов. Подобные результаты были получены и при изучении гидролиза эфиров других групп. Однако при изменении длины ацильной цепи (алкильная группа одна и та же) между холинэстеразами наблюдалось выраженное различие: ацетилхолинэстераза имела отчетливый оптимум с двухуглеродной ацильной группой (ацетат) и нулевую активность в случае бутирата, тогда как у холинэстеразы, наоборот, резкий максимум приходился на бутират.

Имеется много фактов [287], указывающих на то, что обе холинэстеразы обладают особым сродством к метильным группам; поэтому разветвление алкильной цепи увеличивает атакуемость эфиров ферментами (за исключением случая разветвления у углеродного атома, стоящего рядом с эфирной группой). Оптимальной алкильной группой в обоих случаях является, по видимому, 3,3-диметилбутильная группа, которую можно рассматривать как углеродный аналог холина:



ацетилхолин



3,3-диметилбутилацетат

Интересно отметить, что для действия обоих ферментов наличие заряженного атома азота, имеющегося в молекуле холина, не является обязательным, и одним из самых важных факторов оказывается форма молекулы. В то же время холинэстераза обладает более высокой специфичностью, нежели ацетилхолинэстераза: скорость гидролиза углеродного аналога холина при действии ацетилхолинэстеразы составляет 60 % скорости гидролиза ацетилхолина, а при действии холинэстеразы — только 35 %.

Холинэстеразы, подобно карбоксилэстеразе, гидролизуют наряду с алифатическими также и ароматические эфиры, часто с весьма высокой скоростью.

Холинэстераза (бутирилхолинэстераза) наряду с гидролизом ацетилхолина, оказывает аналогичное действие на суксаметоний (деполяризующий миорелаксант), который широко применяется в анестезиологии. Фермент обнаружен во всех клетках кроме эритроцитов. Особенно большое его количество определяется в эмбриональной и плодной ткани головного мозга, опухолях: ганглиобластоме, нейробластоме, менингиоме.

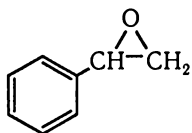
Молекулярная масса фермента составляет 68 кД, количество аминокислотных остатков — 602. Ген холинэстеразы

находится в третьей хромосоме (3q26.1—q26.2). Генетические исследования [302], проведенные с помощью ПЦР, позволили выявить ряд мутаций гена холинэстеразы. Повышенная чувствительность к суксаметонию наблюдается только у гомозигот. Наиболее распространенной мутацией, приводящей к синтезу фермента со сниженной активностью, является замена в нуклеотидной последовательности в положении 209 аденина на гуанин. Другой мутацией, приводящей к синтезу холинэстеразы с резко сниженной активностью, является «вставка» в 117 кодоне нуклеотидной последовательности. Результатом ее является синтез белка, который составляет собой лишь 22 % размера нормального фермента. Гомозиготы по этой мутантной аллели также проявляют повышенную чувствительность к суксаметонию. Еще одна мутация, приводящая к синтезу холинэстеразы со сниженной активностью — замена в положении 243 треонина аминокислотной последовательности на метионин. В результате синтезируется фермент, который в литературе называют фторрезистентной холинэстеразой 1. Гомозиготы по этой мутантной аллели также проявляют повышенную чувствительность к суксаметонию, однако период апноэ у пациентов длится около 30 мин.

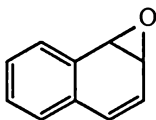
Фенотипирование холинэстеразы для определения ее сниженной активности осуществляется с помощью так называемого «дибукаинового теста», основанного на подавлении активности фермента дибукаином в стандартных условиях. У людей с нормальной активностью холинэстеразы дибукаиновое число равно 88 %. У людей — гомозигот по мутантным аллелям, которые определяют сниженную активность фермента, оно равно 20 %, а у гетерозигот по этим аллелям — 60 %. Следовательно, дибукаиновый тест позволяет не только выявить лиц с повышенной чувствительностью к препарату, но и гетерозигот, что важно для профилактики осложнений у потомства.

8.3.2. ЭПОКСИДГИДРОЛАЗА

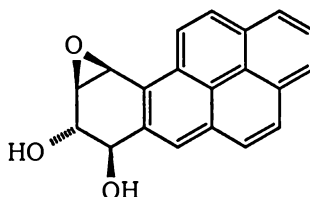
Эпоксисоединения (оксираны) служат исключением из правила, согласно которому большинство простых эфиров устойчивы к расщеплению. Практически все эпоксисоединения, относящиеся к ксенобиотикам формируются в биологических системах и этот процесс катализируется СУР450 (раздел 8.1). Насчитывается три разновидности эпоксисоединений: окиси алкенов (XX), окиси аренов (XXI) и эпоксидиолы (XXII):



XX



XXI



XXII

В отличие от большинства простых эфиров оксираны реагируют со многими сильными нуклеофильными агентами. Эти реакции относятся к одному из случаев нуклеофильного замещения, в котором уходящая группа (кислород окисного кольца) является частью молекулы, претерпевшей замещение. Стереохимия этого процесса находится в соответствии с S_N2 -механизмом — в месте атаки происходит обращение конфигурации. При раскрытии эпоксидных циклов в водном растворе в присутствии кислоты образуются 1,2-гликоли.

Фермент, гидролизующий связь углерод — кислород в оксирановом кольце, называется эпоксидгидролазой, ранее известной как эпоксидгидраза или эпоксидгидратаза [303]. Выделено две изоформы фермента: ЕРНХ1 (микросомальная) и ЕРНХ2 (цитозольная). Большую часть гидролитического расщепления оксиранового кольца ксенобиотиков выполняет ЕРНХ1, состоящий из 455 аминокислотных остатков, с молекулярной массой

52 кД. Ген фермента локализован в первой хромосоме, локус 1q42.1. Другая изоформа (ЕРНХ2) имеет молекулярную массу 62 кД, состоит из 534 аминокислотных остатков, и ее ген находится в восьмой хромосоме, локусе 8p21—p12.

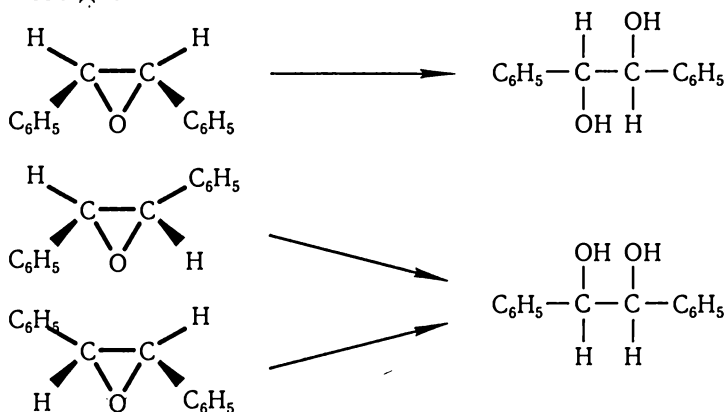
Уже первые исследования ЕРНХ1, где в качестве субстрата была использована окись стирола, показали [304], что фермент экспрессируется в значительных количествах в печени, почках и может быть индуцирован фенobarбиталом и 3-метилхолантеном. Однако более чувствительными методами было доказано, что фермент имеет более широкое распространение в клетках и тканях позвоночных животных [305]. Они включают кожу, селезенку, головной мозг, сердечную мышцу, кишечник, яичники, семенники и др.

Особое значение исследования гидролитического действия ЕРНХ1 приобрели в связи с тем, что метаболиты противосудорожного средства фенитоин оказались субстратами этого фермента. Образуются такие эпокисоединения в монооксигеназном (СУР) катализе и они являются электрофильными продуктами реакции, способными ковалентно связываться с макромолекулами клетки и вызывать побочные эффекты. У животных они выявлены в виде гиперплазии десен или тератогенных эффектов. Такие последствия особенно сильные если в организме содержание ЕРНХ1 меньше 30 % от нормы. Было показано [306], что причиной снижения активности фермента является точечная мутация в третьем экзоне его молекулы, результатом которой является синтез белка, в котором в 113 положении тирозин заменен гистидином. Мутация наследуется по аутосомному рецессивному типу. Снижение активности ЕРНХ1 наблюдается только у гомозигот по этой мутантной аллели. Данных о распространенности гомозигот и гетерозигот по этой мутации нет.

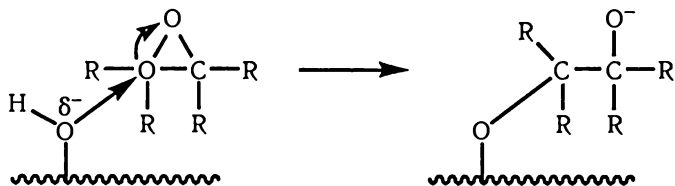
Цитозольная эпоксидгидролазная активность обнаружена в достаточных количествах в тканях мышей и кроликов и очень низких — в организме крыс. В качестве субстратов могут быть использованы как *цис*-эпоксистирол, так и *транс*- β -эпоксиметилстирон [307].

Продуктами реакций, катализируемых эпоксидгидролазой, являются *транс*-дигидродиолы. Если в качестве субстрата используется *цис*-стильбеноксид, то в процессе гидролиза оксиранового кольца образуется (R/R)-гликоль.

Если субстратами эпоксидгидролазы служат (–) (S/S)-*транс*- и (+) (R/R)-*транс*-стильбеноксиды, в результате реакции образуется мезо-диол:



По сравнению с превращением *цис*-стильбеноксида последние реакции протекают очень медленно. Механизм эпоксидгидролазной реакции отличается от классических гидролитических процессов, катализируемых соответствующими гидролазами. У эпоксидгидролазы оксигруппа серина образует ацил-О-ферментный промежуточный комплекс, дающий впоследствии устойчивый эфир [84]:



Он нечувствителен к действию воды даже в том случае, когда в результате внутримолекулярной активации образуется

цис-продукт. Очевидно, эпоксидгиролазный катализ по своей природе соответствует кислотному, в результате которого происходит протонирование кислорода оксиранового кольца.

8.3.3. АМИДАЗЫ

Амиды монокарбоновых кислот (прокаин, бензамид, диметоат) гидролизуются амидазами с образованием соответствующих монокарбоксилатов и аммиака. Исследование [308] распределения фермента, катализирующего расщепление диметоата в органах и тканях животных, показало, что его активность проявляется в большей степени в печени, в меньшей — в мышцах, легких, поджелудочной железе и отсутствует в мозге, селезенке и крови. Наибольшая активность амидазы зарегистрирована в печени кролика и овцы, меньшее — у собак, крыс и незначительная — у мышей, морских свинок и свиней. Около 35 % всей ферментативной активности амидазы приходится на микросомы.

Из печени овцы выделена и очищена амидаза; определены ее свойства. Фермент катализирует гидролиз N-моно- и N,N-дизамещенных амидов. Оптимум pH фермента составляет 9,0. Активность не изменяется при действии двухвалентных катионов в концентрации 10^{-6} моль/л, что отличает фермент от ариламидазы. Молекулярная масса полученной амидазы — 25 кД.

Скорость гидролиза алифатических амидов зависит от длины алкильной группы (табл. 8.11), а ароматических амидов — от природы и положения заместителей в ароматическом ядре [74].

В организме животных аминоэфирная группа карбаматов гидролизуетсся с образованием карбаминовой кислоты и спирта. Этот процесс происходит в плазме крови различных видов млекопитающих и птиц. Активность фермента проявляется к этил-, пропил- и изопропилкарбаматам *n*-нитрофенола. Однако плазма крови не гидролизует N,N-диалкилкарбаматы [309],

Таблица 8.11

Субстратная специфичность амидазы печени овцы

Субстрат	K_m , моль/л	$V_{\text{макс}}$, мкмоль/мг·ч
N-метилформамид	—	—
N-метилацетамид	—	—
N-метилбутирамид	—	—
N-метилвалерамид	$5 \cdot 10^{-3}$	2,82
N-метилкапроамид	$6,6 \cdot 10^{-4}$	1,30
N-метилгептиламид	$1,2 \cdot 10^{-3}$	2,24
N-метилкаприалмид	$3,7 \cdot 10^{-3}$	0,37
N-этилкапроамид	$8,3 \cdot 10^{-4}$	1,71
N-пропилкапроамид	$1,8 \cdot 10^{-3}$	3,42
N-бутилкапроамид	$2,2 \cdot 10^{-3}$	0,09
N-фенилкапроамид	$2,5 \cdot 10^{-3}$	132,40
N,N-диметилкапроамид	$1,9 \cdot 10^{-4}$	0,56
N,N-диэтилкапроамид	—	—

а микросомные гидролазы катализируют превращение только незамещенных карбаматов, но такой путь метаболизма имеет второстепенное значение.

Рассматривая амидазу в качестве основного примера гидролитического расщепления С—N-связей, отличающихся от пептидных связей, необходимо обратить внимание на то, что аналогичные функции, в некоторых случаях, может выполнять и карбоксилэстераза. Так, известно [310], что местный анестетик бутанилкаин является подходящим субстратом карбоксилэстеразы различного происхождения (печени крыс, свиньи и человека). По скорости гидролитической реакции он мало чем уступает типичным субстратам фермента (сложным эфирам). Анилиды, сходные по структуре с лидокаином, гидролизуются карбоксилэстеразой печени свиней с большей скоростью в том случае, когда их молекула содержит моно-N-алкил группу, связанную с глицином, в отличие от ди-N-алкилпроизводных. Однако аминоэфирная

группа карбонатов практически не гидролизуются гомогенатами печени свиней [311].

Анальгетики фенацетин и парацетамол также относятся к субстратам карбоксилэстеразы [298].

Гидролиз антибиотиков (хлорамфенинол, пенициллин) осуществляется как карбоксилэстеразами, так и амидазами, что позволило авторам исследования [298] отнести фермент изолированный из печени человека и мышей, а также из микроорганизмов, к *B*-типу карбоксилэстеразы/амидазы.

Гидроксамовые кислоты и гидразиды ароматических кислот гидролизуются в ароматические карбоновые кислоты.

В заключение отметим, что гидролитическое расщепление амидных связей, рассмотренное в данном разделе, может квалифицироваться как своего рода реакция деацетилирования, т. е. обратная процессу ацетилирования (раздел 8.4.4).

8.3.4. β -ГЛЮКУРОНИДАЗА И СУЛЬФАТАЗА

Гидролиз гликозидов и сульфатов представляют собой еще один пример обратимых реакций, катализируемых различными ферментами; образование глюкуронидов и сульфатов происходит с участием уридиндифосфатглюкуронозилтрансферазы (UGT) и сульфотрансферазы соответственно (раздел 8.4), а их расщепление- β -глюкуронидазой и сульфатазой.

Учитывая тот факт, что β -глюкуронидаза относится к гликозидазам, но она как и все ферменты этой группы расщепляет в основном субстраты, в молекуле которых не содержится заряженных групп. В этих субстратах доминирующую роль играет расположение гидроксильных групп и атомов водорода и специфичность гликозидаз определяется конфигурацией каждой —СНОН-группы. Как правило, гликозидазы проявляют высокую степень специфичности по отношению к определенному моносахаридному кольцу; однако присоединенная агликоновая

группа также может оказывать более или менее заметное влияние. Глюкурониды эндогенных и экзогенных соединений имеют β -конфигурацию и гидролизуются β -глюкуронидазой. Фермент катализирует расщепление эфирных и сложноэфирных связей в глюкуронидах и в незначительной степени — эфирные связи серной кислоты. Обнаружен он в микросомах и лизосомах печени, почках, селезенке, пищеварительном тракте и половых железах животных [311]. Микросомная β -глюкуронидаза-мембраносвязанный фермент, чувствительный к агентам, влияющим на гидрофобные взаимодействия в этих структурах [312]. Молекулярная масса фермента печени крыс равна 29 кД, а почек мышей — 30 кД [313, 314]. Оба фермента — тетрамеры и одна из полипептидных цепей представляет собой каталитическую субъединицу, а другая связывает фермент с мембраной. Для высокоочищенной формы β -глюкуронидазы характерно незначительное количество серосодержащих аминокислот [315]. Однако 6,3 % приходится на углеводы, среди них манноза и глюкозамин занимают превалирующее положение. Предполагается, что фермент существует в нескольких изоформах.

Наличие β -глюкуронидазы в эндоплазматической сети гепатоцитов, участке где сосредоточена большая часть UGT, катализирующей образование глюкуронидов делает непонятной функциональную роль этой гликозидазы. Можно предположить, что микросомальная β -глюкуронидаза использует в качестве субстратов глюкурониды, образующиеся в эндоплазматической сети или те, что поступают в гепатоциты из других участков организма (например, кишечник). В последнем случае необходимы условия для направленного транспорта глюкуронидов, по крайней мере, в гепатоцит. Используя различные методические подходы [316] по изучению проницаемости мембран гепатоцитов и изолированных микросомных везикул, было показано, что они остаются практически непроницаемы для глюкуронидов и глюкуронатов. Следовательно, присутствие β -глюкуронидазы в эндоплазматической сети может быть объяснено некой необходимой коррекцией содержания глюкуронидов в гепатоцитах.

Значительная β -глюкуронидазная активность отмечена в кишечнике человека, и экспериментальных животных. Ферменты микроорганизмов гидролизуют фенилглюкуронид, морфиновые, тироксиновые глюкурониды, а также конъюгаты диэтилстильбэстрола, хлорамфеникола и 4-диметилгризеофульвина [83, 84]. Если в качестве субстрата используется глюкуронид морфина, то в основном, на долю ферментов *E.coli* приходится основная часть работы по расщеплению гликозидной связи [317]. Верапамил ингибирует β -глюкуронидазу *E.coli*, тем самым влияя на фармакокинетические показатели как морфина, так и его глюкуронида.

Целый ряд флавоноидов являются одновременно субстратами для ферментов микрофлоры кишечника и слизистой [318]. Варьируя заместителями в молекуле кверцитина отмечалось, что β -глюкуронидазы микрофлоры и слизистой кишечника человека значительно отличаются друг от друга субстратной специфичностью. Отсюда возможность полифенолов, используемых в качестве пищевых добавок, регулировать пути образования глюкуронидов, их расщепление, а отсюда и степень всасывания [319].

Ферментативное расщепление эфирсульфатов катализируется сульфатазами. В метаболизме чужеродных соединений наибольшее значение имеет арилсульфатаза. Фермент, находящийся в эндоплазматической сети — называется арилсульфатаза I или сульфатазой C, а в лизосомах-арилсульфатазой II или сульфатазами A и B (2-изоформы). Молекулярная масса сульфатаз C, A и B соответственно составляет 423, 102 и 55 кД [320], а их маркерными субстратами являются сульфаты *n*-нитрокатекола, *n*-нитрофенола.

Среди сульфатаз, участвующих в метаболизме (гидролизе) природных соединений в достаточной степени изучены глюкосульфатазы, хондроктинсульфатазы и особенно стероидсульфатазы [321]. Непосредственно на примере стероидсульфатазы и сульфотрансферазы (SULT1E1) изучены [322] взаимодействия обоих ферментов в общем цикле (рецикле) метаболических

превращений стероидов. Отметим, что такие процессы становятся доступными для анализа и на изолированных гепатоцитах, и культурах этих клеток, так как ферменты в достаточной степени могут быть экспрессированы в них [323].

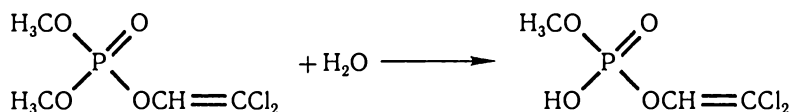
Практически все перечисленные сульфатазы имеют идентичный активный центр. Методами рентгеноструктурного анализа показано [324], что активный участок ферментов представлен кластером, состоящим из консервативного участка и посттрансляционно модифицированного остатка цистеина (Cys 91). Двойная замена (Cys91Ser и Cys91Thr) приводит к полной потере гидролитической активности [324]. Консервативным участком ферментов считается своего рода «карман», состоящий из Asp 53, Asp 54, Cys 91, Pro 93, Ser 94, Arg 95, Lys 145, His 147, His 242, Asp 300 и Lys 318. Собственно такое расположение активного центра и его микроокружение является характерным для α/β семейств ферментов и щелочной фосфатазы [325].

В последнее время обнаружены мутации в молекуле у фосфатаз, связанные с однонуклеотидной заменой в структуре гена. Их насчитывается 16 [326] и они характеризуются следующими заменами аминокислот: Thr92Met, Arg95Gln, Cys117Arg, Gly137Tyr, Gly144Arg, Arg152Trp, Arg160Cln, Cys192Arg, Tyr210Cys, Leu236Pro, Leu321Pro, His393Pro, Cys405Tyr, Leu498Pro, Cys521Tyr, ter534Gln (ter — терминальный кодон). Среди всех мутаций, только Arg95Gln присущ активный центр, а отсюда и некоторая сульфатазная активность [324].

8.3.5. НЕКОТОРЫЕ РЕАКЦИИ ГИДРОЛИТИЧЕСКОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВ, КАТАЛИЗИРУЕМЫЕ ФЕРМЕНТАМИ НЕУСТАНОВЛЕННОЙ ПРИРОДЫ

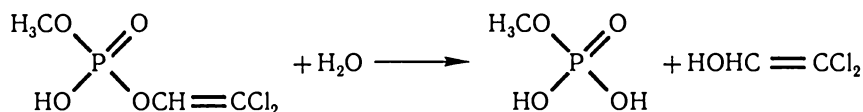
Некоторые фосфорорганические соединения, содержащие эфирную связь, гидролизуются ферментами неуставленной

природы. Таким способом О,О-диметил-О-2,2-дихлорфенилфосфат (ДДВФ) в организме экспериментальных животных теряет метильную группу:



На первый взгляд может показаться, что это — процесс О-деметилирования, имеющий место в микросомах печени. Исследования реакции показали [327], что она не нуждается в НАДФН и цитохроме Р450. В то же время неясно, участвует ли в этом процессе эндогенный глутатион или нет, т. е. не является ли реакция глутатионтрансферазной. Процесс можно отнести к гидролитическим, так как превращение ДДВФ активируется ионами Mn^{2+} и в результате реакции не образуются этанол, ацетальдегид или S-этилглутатион.

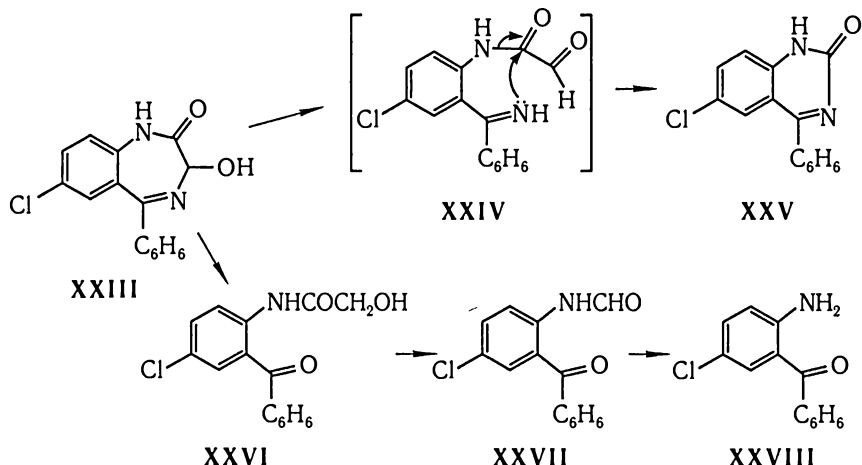
Фосфориды диэфира (диметил—ДДВФ) гидролизуются ферментами растворимой фракции печени крыс и гомогенатами печени свиней:



Активность очищенного фермента печени крыс оптимальна при рН 6,9. Этиленаминотетраацетат активирует, а фосфорная кислота и высокие концентрации ионов Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} (1 мМ) ингибируют его активность [328].

Еще более запутанной и сложной является проблема одно-временных реакций сужения гетероциклического кольца и его полного раскрытия. Таких примеров насчитывается достаточное количество и особенно ярко это явление выражено у транквилизаторов 1,4-бенздиазепинового ряда [329]. Нашими исследованиями [330, 331] было показано, что сужение семичленного

бенздиазепинового кольца до шестичленного катализируется ферментами, находящимися в микросомальной части гепатоцитов. Механизм такой реакции включает в себя образование 3-оксиметаболита (XXIII), который таутомерно превращается в глиоксальное производное кетимина (XXIV) с последующей циклизацией до хиназолин-2-она (XXV). Ферментная система, участвующая в этом процессе индуцируется фенобарбиталом и 20-метилхолантrenom, а также ингибируется SKF-525 A [332].



По-видимому, ферменты микросом печени крыс участвуют в этом процессе на стадии XXIII → XXIV. Наш механизм рассматриваемой реакции отличается от других авторов [333], считающих, что используемые в исследованиях субстраты на одной из стадий превращения должны образовывать 1,4-бенздиазепин-2,3-дионы. Однако сами исследователи и мы не обнаружили их в качестве промежуточных соединений в организме экспериментальных животных.

Гидролитическое расщепление 1,4-бенздиазепинов до бензофенонов (XXVIII) включает также обязательное образование 3-оксипроизводного. Следовательно, как в реакциях сужения бенздиазепинового цикла до хинозалина, так и образования раскрытого цикла — бензофенонов источником (субстратом)

служит 3-оксипроизводное. В последнем случае гидролиз протекает через стадию образования оксиацетиламинобензофенона (XXVI) и формиламинобензофенона (XXVII).

Видовые различия, наблюдающиеся [331] в процессе определения образующихся бензофенонов в организме животных и предложенный механизм гидролитического расщепления гетерокольца 1,4-бенздиазепинов позволяет предположить, что этот процесс катализируется несколькими ферментами, мало-специфичными к субстрату.

8.4. КОНЪЮГАЦИЯ

К конъюгационным относятся процессы биосинтеза, в результате которых из ксенобиотиков или их метаболитов и эндогенных агентов (глюкуроновой кислоты, ацетила, сульфата, глицина и др.) образуются сложные вещества. Как и большинство биосинтетических реакций, это — энергозависимые процессы, подразделяющиеся на две группы [84]. В основу классификации положена природа активных промежуточных продуктов реакций. Первую группу составляют процессы, в результате которых образуются активированные конъюгирующие агенты:

конъюгирующий агент $\xrightarrow{\text{энергия}}$ активированный конъюгирующий агент $\xrightarrow{\text{субстрат}}$ продукт конъюгации.

Для второй группы характерно образование активированного субстрата:

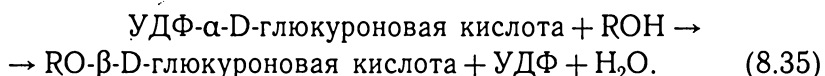
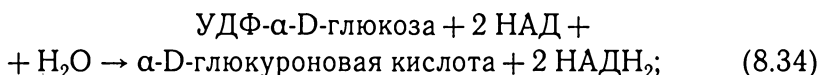
субстрат $\xrightarrow{\text{энергия}}$ активированный субстрат $\xrightarrow{\text{конъюгирующий агент}}$ продукт конъюгации.

К первому типу относятся реакции метилирования, ацетилирования, образование глюкуронидов, гликозидов и сульфатов, ко второму — аминокислотная конъюгация.

8.4.1. УРИДИНДИФОСФАТГЛЮКУРОНОЗИЛТРАНСФЕРАЗА И ДРУГИЕ ФЕРМЕНТЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ СИНТЕЗ УГЛЕВОДНЫХ КОНЬЮГАТОВ

Конъюгация ксенобиотиков с глюкуроновой кислотой — наиболее важный механизм детоксикации ксенобиотиков, который происходит в организме большинства позвоночных животных. Катализирует процесс уридиндифосфатглюкуронозилтрансфераза (UGT).

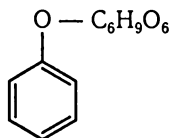
Глюкурониды ксенобиотиков в организме животных получают в несколько стадий. Сначала синтезируется активированный интермедиат уридиндифосфатглюкуроновая кислота (УДФГК), затем глюкуроновая кислота переносится от УДФГК на субстрат:



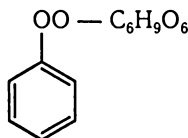
Фермент, катализирующий реакцию (8.34), — УДФ-глюкозодегидрогеназа — локализован в растворимой фракции печени животных.

В глюкуронатксилулозном цикле клетки может образовываться в значительных количествах свободная глюкуроновая кислота, прежде всего за счет гидролиза УДФГК, который катализируется УДФ-глюкуронатпирофосфатазой, а также окислением мезо-инозита с помощью монооксигеназы. В свою очередь УДФГК в результате последовательного взаимодействия с УДФ-N-ацетилглюкозамином образует в клетках животных гиалуриновую кислоту. Свободная D-глюкуроновая кислота является предшественником L-аскорбиновой кислоты. Конъюгаты ксенобиотиков с глюкуроновой кислотой обладают β -пиранозной структурой и классифицируются как О-, N-, S- и C-глюкурониды [20, 82].

О-глюкурониды образуются из спиртов, фенолов и карбоновых кислот. Наиболее часто встречается эфирный тип *О-глюкуронидов* (XXIX), синтезирующихся присоединением остатка глюкуроновой кислоты к первичным, вторичным и третичным спиртам, а также к фенолам:

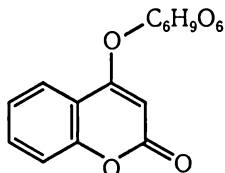


XXIX

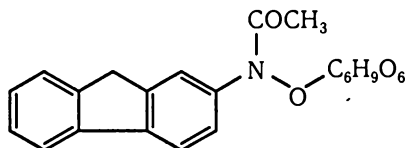


XXX

Они устойчивы к щелочам и медленно гидролизуются кислотами. Из карбоновых кислот получают сложноэфирные глюкурониды (XXX), а из псевдокислот — фенольные (XXXI). Оба эти типа соединений неустойчивы в щелочах и восстанавливают щелочные медные реактивы [74]. Гидроксиламиновый тип *О-глюкуронидов* образуется из *N*-окси-2-ацетиламинофлюорена, и его часто называют *N*-оксиглюкуронидом (XXXII).



XXXI

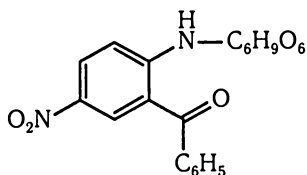


XXXII

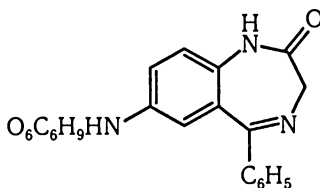
N-глюкурониды. У многих органических соединений атом азота может присоединять остаток глюкуроновой кислоты. Такой атом азота может находиться в amino- и сульфамидной группах или в гетероциклическом азотистом соединении. Ароматические и алифатические аминоглюкурониды лабильны в кислых растворах и восстанавливают реактив Бенедикта. Наиболее устойчивы амид-*N*-глюкурониды (сульфатиазол-*N*-глюкуронид и *N*-глюкуронид мепробамата).

Нами показано [335], что некоторые из *N*-глюкуронидов: образующихся в организме крыс, выделяются не только

с мочой, но и экскретируются с желчью в виде XXXIII, XXXIV:

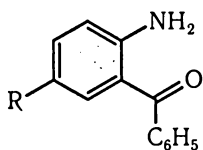


XXXIII



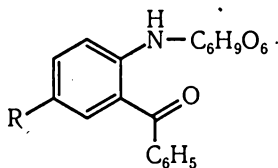
XXXIV

Синтез аминоглюкуронидов зависит от физико-химических свойств, субстратов [335]. Внутривентриальное введение крысам 5-замещенных 2-аминобензофенонов показало, что в водной фазе мочи, которая была обработана β -глюкуронидазой, все исследуемые субстраты (XXXV) в организме экспериментальных животных конъюгируют с глюкуроновой кислотой, образуя соответствующие N-глюкурониды (XXXVI):



XXXV

R = NH₂, CH₃, H, Cl



XXXVI

Количество выделившихся с мочой исходных соединений и их глюкуронидов представлено в табл. 8.12 из которой видно,

Таблица 8.12
Экскреция с мочой свободных бензофенонов и их аминоглюкуронидов
(n = 8—10)

R	Содержание в моче крыс бензофенонов, нмоль			
	Свободная форма		Аминоглюкуронид	
	24 ч	48 ч	24 ч	48ч
NH ₂	116 ± 10,1	181 ± 17,2	53,4 ± 5,6	72,4 ± 7,7
CH ₃	534 ± 62,1	678 ± 81,9	113,4 ± 19,6	170,0 ± 22,0
H	292 ± 21,0	469 ± 30,2	40,3 ± 6,0	65,8 ± 11,3
Cl	78,4 ± 8,8	124 ± 11,6	31,5 ± 3,2	55,3 ± 4,6

что за 24 и 48 ч исходные соединения выводятся из организма экспериментальных животных в неодинаковом количестве.

Отмечено наиболее высокое содержание в моче метилзамещенного и самое низкое — хлорсодержащего 2-аминобензофенона. На основании сказанного все исследуемые вещества можно расположить в следующий ряд: $\text{CH}_3 > \text{H} > \text{NH}_2 > \text{Cl}$. Аминоглюкурониды же располагаются в ином порядке: $\text{CH}_3 > \text{NH}_2 > \text{H} > \text{Cl}$. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что выведение из организма белых крыс исследуемых веществ в свободном состоянии и синтез глюкуронидов зависят от любой незначительной модификации структуры молекулы (табл. 8.13).

Таблица 8.13

Значение констант Гаммета (σ_p), основности ($E^{1/2}$) и липофильности (π) 5-замещенных 2-аминобензофенонов

R	σ_p	$E^{1/2}, \text{В}$	$\pi = \lg P$
NH_2	– 0,66	4,91	1,833
CH_3	– 0,17	6,86	3,088
H	0	5,57	3,536
Cl	0,23	7,50	3,180

Сопоставление физико-химических свойств субстратов с количеством образовавшихся аминоглюкуронидов указывает на то, что определенная зависимость наблюдается только в случае констант Гаммета заместителей. Такая корреляция отмечается при исследовании в течение 24 и 48 ч (рис. 8.6).

Аминоглюкурониды могут быть синтезированы в организме экспериментальных животных и человека из третичных [336], четвертичных аминов и аммониевых соединений [337].

S-глюкурониды. Глюкуроновая кислота конъюгирует с тиоловыми соединениями с образованием S-глюкуронидов. Примером таких веществ могут служить глюкурониды 2-меркаптобензтиазола, тиофенола и антабуса [74].

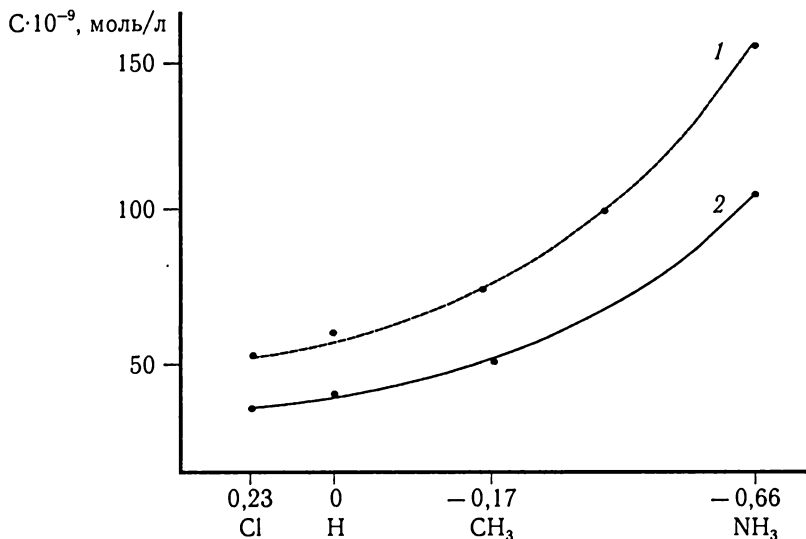
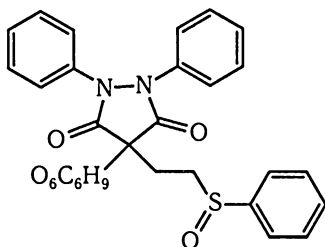
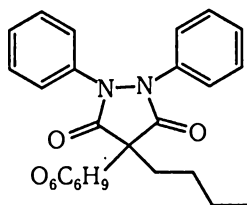


Рис. 8.6. Зависимость количества образовавшихся аминоглюкуронидов от констант Гаммета заместителей 5-замещенных 2-аминобензофенонов: 1 — через 24 ч; 2 — 48 ч

С-глюкурониды. Из организма людей, принимавших сульфингидразон (антуран) или фенилбутазол (бумазолин) выделены и идентифицированы физико-химическими методами соответствующие С-глюкурониды (XXXVII, XXXVIII):



XXXVII



XXXVIII

У таких метаболитов углеводородный атом лиганда глюкуроновой кислоты непосредственно связан с углеродным атомом пиразолидинового кольца [338].

8.4.1.1. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ТКАНЕВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ UGT

Номенклатура УДФ-глюкуронозилтрансфераз базируется на девергентной эволюции генной последовательности фермента. Как и в случае CYP450 (раздел 8.1.1.1.1) аббревиатурой для ферментов человека и экспериментальных животных, кроме мышей является UGT. Для мышей используется обозначение Ugt. Все суперсемейства UGT делят на два семейства UGT1 и UGT2.

Предполагается [339] наличие более 50-ти изоформ UGT. На сегодняшний день идентифицированы и клонированы 16 изоформ UGT человека, UGT1 включает 8 генов, UGT2 содержит 7 генов. Продукты генов UGT1 на 38—48 % отличаются от аналогичного показателя UGT2. Изоферменты, семейства UGT1 сходны по аминокислотному составу на 62—80 %, а семейства UGT2 — на 57—93 %. Индивидуальные формы трансфераз являются продуктами UGT1A1 гена, которые состоят из общего для них карбоксильного концевой домена, и отличающихся аминоконцевыми участками. Несмотря на наличие общего концевой карбоксильного участка, состоящего из 245 аминокислот, продукты UGT1A гена регулируются и транскрибируются индивидуально.

В целом, UGT человека содержит 529—534 аминокислоты и их последовательность включает в себя консервативный участок на С-конце цепи, который фиксирует фермент в мембране эндоплазматической сети. Все UGT, кроме UGT1A10, содержат N-концевой сигнальный белковый домен, который ориентирует белок в эндоплазматическую сеть [339].

Локус UGT1A содержит более 150 т. п. н., находится во второй хромосоме (2q37) и кодирует UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10. Этот локус характеризуется уникальной генетической организацией, которая сочетает в себе блоки индивидуального первого экзона на 5'-конце и общие экзоны (2—5) на 3'-конце локуса [340].

Гены UGT2B были картированы в 4-й хромосоме (4q13 и 4q27). Они кодируются отдельно и содержат 6 экзонов. В настоящее время идентифицированы транскрипты UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11, UGT2B15 и UGT2B17. Кроме того, клонирован ген UGT2A1, локализующийся в обонятельных тканях [341].

Наличие изоформ UGT обнаружено практически во всех таксономических группах позвоночных животных, начиная от рыб и кончая всеми млекопитающими. В организме новорожденных активность фермента низкая, однако к 1—3 месяцам жизни она сравнима с таковой у взрослых. Трансфераза находится в кишечнике, легких, головном мозге, почках, обонятельном эпителии, но главным органом, в котором идет образование глюкуронидов, является печень. Различные изоформы UGT в неодинаковой степени экспрессируются в различных органах и тканях. Так UGT1A1, катализирующий глюкуронирование билирубина экспрессируется, главным образом, в печени, но не в почках. Однако, UGT1A6 и UGT1A9, для которых маркерными субстратами являются фенолы экспрессируются в равной степени как в печени, так и в почках [342].

Многочисленные лекарственные средства относятся к непосредственным субстратам UGT (табл. 8.14) и еще большая часть является опосредованными субстратами, т. е. образующимися в реакциях, катализируемыми ферментами первой фазы метаболизма ксенобиотиков.

Начальный этап исследования физиологической роли глюкуронизации в организме человека был основан на выделении и очистке белков UGT из печени. Внедрение новых технологий молекулярной биологии привело к идентификации новых изоформ фермента, установлению каталитических функций UGT. Освещена их роль в развитии различных патологий у человека, в том числе и неконъюгированных гипербилирубинемий, канцерогенеза, аутоиммунных процессов.

Открытие в 1991 г. UGT, превращающей билирубин человека в соответствующий глюкуронид, послужило началом изучения

Таблица 8.14

Лекарственные препараты — непосредственные субстраты UGT [341]

UGT1A1	UGT1A4	UGT1A6	UGT1A10	UGT1A9	UGT1B7
Билирубин Бупренорфин	Имипрамин Амитриптилин Хлорпромазин Ламотриджин Доксепин Прометазин Ципрогептидин Кетотифен	1-нафтол Ацетаминофен Буметанид Ибупрофен Вальпроат	Микофенольная кислота	Профол Вальпроат Напроксен Кетопрофен Лабетол Пропранолол Этинилэстрадиол Дапсон Микофенольная кислота	Морфин Клофибрат Фенопрофен Зомепирак Дифлунизал Фенопрофен Ибупрофен Кетопрофен Оксазепам

Примечание: первыми в таблице представлены маркерные субстраты

локуса UGT1A. Начиная с этого времени, идентифицировано 33 аллели UGT1A1 и стало понятным, что неконъюгированная гипербилирубинемия — результат гомозиготной или компаундной гетерозиготной мутации этой изоформы [343]. UGT1A1 является единственным эффективным ферментом глюкуронизации билирубина у человека. Это было доказано после обнаружения мутаций исключительно экзон 1 — кодирующего участка UGT1A1, которые приводят к полному отсутствию глюкуронизации билирубина у больных людей. Из-за этого все остальные продукты гена UGT1A1 интактны. Полное отсутствие активности UGT1A1 ведет к летальному типу 1 болезни Криглера-Найара. Снижение активности билирубина меньше, чем на 30 %, характерно для болезни Криглера-Найара типа 2. Установлено также, что причиной болезни Гилберта является мутация промотора UGT1A1, приводящая к уменьшению экспрессии продуктов этого гена. Анализ известных 32 полиморфных аллелей UGT1A1 показал, что мутантные аллели как при типе 1, так и при типе 2 болезни Криглера-Найара, могут затрагивать все пять экзонов. Различные комбинации мутаций промотора и гомозиготной или компаундной гетерозиготной комбинации, кодирующих участков мутантных аллелей может привести ко всем описанным выше патологиям. На основании этих исследований полагают, что неконъюгируемая билирубинемия наследуется скорее по аутосомно-рецессивному типу [344, 345].

Первоначально, основываясь на открытии UGT билирубина, считали, что глюкуронизация характерна для метаболических процессов печени. Это было доказано путем клонирования UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9 из кДНК библиотек печени.

Принимая во внимание предположение о том, что UGT может функционировать как метаболический барьер, необходимый для тканей, взаимодействующих с ксенобиотиками, например, желудочно-кишечного тракта, была разработана основанная на ПЦР методология для определения индивидуальных UGT1A экзонов с высокой гомологией.

Исследования показали [346], что активность UGT имеется в почках, тонкой и толстой кишке. Анализ тканей пищевода, желчного пузыря и толстой кишки показал присутствие активности фермента и экспрессию иРНК UGT1A в этих органах, которые непосредственно контактируют с поглощенными человеком веществами. При этом были выделены новые UGT и РНК, не присутствующие в печени: UGT1A7 — в пищеводе и желудке, UGT1A8 — в пищеводе и толстой кишке и UGT1A10 во всем желудочно-кишечном тракте, кроме печени. Внепеченочные продукты гена UGT1A были подвержены молекулярно-генетическим исследованиям, что позволило выявить типичные транскрипты UGT1A с отличающимся первым экзоном. Как UGT1A7, так и UGT1A10 обладали каталитической активностью; они глюкуронировали простые и сложные фенольные субстраты, как и печеночные UGT1A6 и UGT1A9.

UGT1A10 проявлял каталитическую активность по отношению к стероидным гормонам (β -эстрадиол, эстрон, андростерон), но все они не метаболизируются UGT1A7. Есть и другие особенности этих изоформ. Таким образом, существует качественное и количественное отличие в регулировании UGT в печени и других органах желудочно-кишечного тракта, что составляет биохимическую основу тканеспецифической глюкуронизации у человека.

Исследование ферментативной активности в печени и толстой кишке человека показало отличие каталитических профилей этих органов. Скорость активности в печени по отношению к фенольным субстратам была в 96 раз, а к 4-изопропилфенолу в 64 раза выше, чем в толстой кишке. Однако скорость конъюгирования группы химических соединений, включающих амитриптилин, демипрамин, эстрон, имипрамин, ацетаминофен была сравнима в обоих органах. Это указывает на тканеспецифическое распределение глюкуронизации в тканях человека и позволяет считать толстую кишку местом активного метаболизма [347].

При анализе желудочного эпителия, был определен полиморфный характер экспрессии продуктов гена UGT1. Установленный

регуляторный полиморфизм, который отличается от бимодального распределения генетического полиморфизма, обнаруженного у других ферментов метаболизма лекарственных средств, что может быть биохимической основой межиндивидуальных отличий во внепеченочном микросомальном метаболизме лекарственных средств.

В 1973 г. у человека были выявлены аутоантитела против эндоплазматической сети клеток печени и проксимальных почечных канальцев (печень-почки микросомальные — LKM аутоантитела). В настоящее время их рассматривают как антитела против микросомальных ферментов, метаболизирующих лекарственные средства. С помощью LKM-аутоантител (анти CYP2D6), как серологических маркеров, идентифицировали клинически различимую вторую форму аутоиммунного гепатита (аутоиммунный гепатит тип 2). Другой тип LKM-аутоантител был открыт в 1983 г. у больного с хроническим гепатитом D. Их обозначили как LKM-3 и установили, что эти антитела направлены против семейства UGT1. Как серологические маркеры они были обнаружены у 10 % больных гепатитом D. Кроме того, LKM-3 выявлялись у 10 % больных аутоиммунным гепатитом типа 2. У человека антигенами для LKM-3 были определены UGT1A1, UGT1A6, UGT1A4, а у кролика — UGT1A6 [348].

В-клеточный иммунный ответ при гепатите C и гепатите D является специфичным и неперекрестным. LKM-3-анти-UGT1A аутоантитела не определены при аутоиммунном гепатите тип 1, а также при вирусном гепатите C. В то же время, LKM-1-анти-CYP2D6 аутоантитела не определяются при гепатите D, но есть при гепатите C.

На основании этого высказывается мнение, что белки CYP и UGT могут становиться мишенями иммунной системы при взаимодействии вируса и специфической эндогенной иммунологической дисрегуляции. Эти аутоантигенные мишени могут служить моделью для изучения механизма потери аутоотолерантности, составляющей основу аутоагрессии (Глава 10).

Рассматривая мутации генов UGT необходимо обратить внимание на уникальный случай в фармакогенетике — стереоизбирательный полиморфизм фермента. Известно, что все 3-оксипроизводные 1,4-бенздиазепинов имеют в структуре хиральный центр [329]. При введении пациентам рацемической формы оксазепам предпочтительнее выводится с мочой S-глюкуронид и поэтому соотношение S/R — глюкуронидов может служить маркером нормального состояния UGT2B7 [349]. Выяснено [350], что около 10 % всей популяции людей в значительно меньшей степени образуют S-глюкуронид оксазепам, что по-видимому связано с полиморфизмом изофермента.

8.4.1.2. СОПРЯЖЕННОСТЬ РЕАКЦИЙ ГЛЮКУРОНИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВ С ДРУГИМИ ПРОЦЕССАМИ БИОТРАНСФОРМАЦИИ

Поскольку многие ксенобиотики образуют глюкурониды лишь после окисления, а ферменты, катализирующие эти процессы, локализованы в эндоплазматическом ретикулуме, предполагают, что они функционально и топологически тесно связаны между собой. Об этом свидетельствуют данные, полученные Франклином [351], который инкубировал *n*-нитроанизол в присутствии кофакторов, обеспечивающих его О-деметилование и последующую конъюгацию с глюкуроновой кислотой в микросомах. В такой системе *n*-нитрофенилглюкуронид является слабым ингибитором гидроксилирующего комплекса (CYP).

Гидроксилирование ксенобиотиков и синтез глюкуронидов на их основе — взаимосвязанные процессы и в опытах *in vivo*. Однако в плазме крови и моче экспериментальных животных всегда обнаруживается незначительное количество окисленных продуктов по сравнению с их глюкуронидами. При перфузии печени средой, содержащей *n*-нитроанизол, *n*-нитрофенол в перфузате не обнаруживается. Оказалось, что он полностью

превращается в глюкуронид или сульфат. При повышении концентрации субстрата наблюдается тенденция к усилению синтеза глюкуронидов [352].

Высказано предположение [353], что ферменты, гидроксилирующие ксенобиотики и синтезирующие их глюкурониды, образуют мультиферментный комплекс в эндоплазматическом ретикулеуме, имеющий векторное расположение. Эти ферменты прочно связаны с мембраной, являясь своего рода иммобилизованными, и, возможно, имеют жесткую организацию, а также типичное микроокружение. Иммобилизация последовательно действующих ферментов и их взаимосвязь вызывают увеличение локальной концентрации промежуточных продуктов реакции в зоне микроокружения ферментов. Следовательно, последующий фермент, в данном случае UGT, интенсифицирует синтез глюкуронидов и увеличивает скорость всей реакции, т. е. окисление — синтез. Сделана попытка [20; 82] объемно представить взаимодействие микросомных цитохромов, флавопротеида и пиридиннуклеотидов между собой и UGT (рис. 8.7).

Создание схемы кластерной организации CYP450 и UGT основано на следующих дополнительных гипотезах [339].

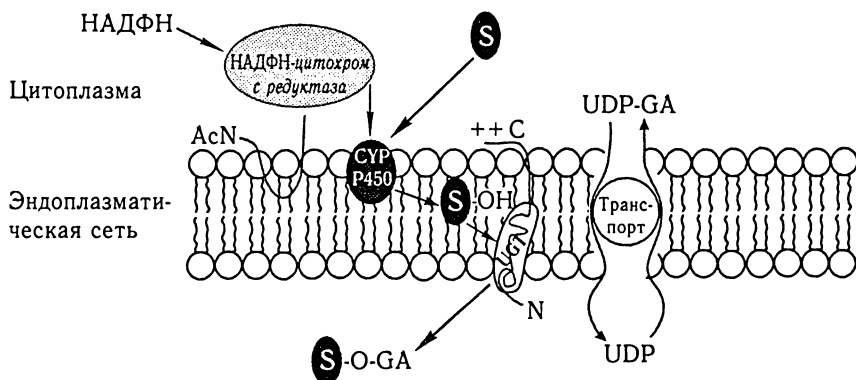


Рис. 8.7. Гипотетическая схема кластерной организации CYP450 и UGT в эндоплазматической сети (UDP — уридиндифосфат, UDP-GA — уридиндифосфатглюкуронова кислота, S — субстрат, S—OH — окисленный субстрат, S-O-GA — глюкуронид, транспорт-перенос UDP)

Цитохром b_5 является источником второго электрона в монооксигеназном катализе (раздел 8.1.1.1). Пространственное расположение компонентов комплекса жесткое и CYP450 не обеспечивает соседние вещества электронами [351]. В то же время CYP450 лабилен внутри одного комплекса и находится в тесном контакте с UGT в эндоплазматической сети [354]. В свою очередь UGT расположена позади липидного барьера, вероятно, на внутренней поверхности мембраны везикулы.

Процессы гидроксилирования и синтеза глюкуронидов индуцируются барбитуратами и полициклическими углеводородами. Вначале индуцируется гидроксилирующий комплекс, а затем UGT. Поэтому их индукция, хотя и не подчинена одному и тому же механизму генетического контроля, все же считается взаимосвязанной. Возможно, в процессе гидроксилирования образуются метаболиты, усиливающие активность UGT [355]. Введение в желудок крыс четыреххлористого углерода, SKF-525A и гематина почти полностью блокирует микросомальное окисление ксенобиотиков, а также подавляет вызванное 3,4-бензпиреном увеличение активности CYP450 и UGT [356].

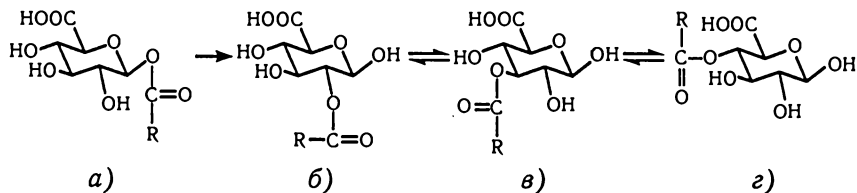
Существует ряд возражений против того, что гидроксилирующий комплекс и UGT образуют в эндоплазматическом ретикулеуме мультиферментный комплекс. Прежде всего данные межспецифического и тканевого распределения, так же как и ингибиторный анализ обоих процессов *in vivo*, подтверждают, что синтез этих ферментов контролируется с помощью различных механизмов. В гепатоцитах крыс линии Ган и в печени куриного эмбриона активность гидроксилирующего комплекса и UGT может быть увеличена независимо друг от друга [356]. Кроме того, указанные ферменты находятся в неодинаковых соотношениях в различных органах и тканях экспериментальных животных, а также развиваются в характерные для организма сроки. Некоторые данные свидетельствуют о том, что гидроксилирующий комплекс расположен ближе к поверхности мембраны, чем UGT, и при хроматографическом разделении мембран микросом, обработанных поверхностно-активными

веществами и фосфолипазами, их соотношение отличается от интактных структур [357]. Не исключена возможность, что активация UGT особенно значительна в том случае, когда в силу некоторых причин происходит разрушение гидроксилирующего комплекса, т. е. как в случае системы монооксигеназа—эпоксидгидролаза [358].

Что касается возможного взаимодействия UGT и β -глюкуронидазы, то вопросы, касающиеся этой проблемы рассмотрены нами ранее (раздел 8.3.4).

В связи с обсуждаемой проблемой особое значение имеют сложноэфирные глюкурониды, которые в некоторых случаях называют ацилглюкуронидами [341], их химические свойства и образование в реакции S_N 2-го типа, сопровождающейся обращением конфигурации рассмотрены в обзоре [359]. Такой структуры глюкурониды образуют нестероидные противовоспалительные средства. В нормальных условиях они образуются в организмах, а затем выводятся с мочой. Однако в некоторых патологических ситуациях, сопровождающихся задержкой выведения глюкуронидов, они накапливаются в плазме крови [360]. Такое накопление ацилглюкуронидов в плазме крови объясняется миграцией ацильной группы в молекуле гликона (глюкуроновой кислоты). Изучение свойств таких изомеров показало [361] их способность связываться с альбумином как в опытах *in vitro*, так и *in vivo*. На схеме (рис. 8.8) представлены механизмы этого процесса:

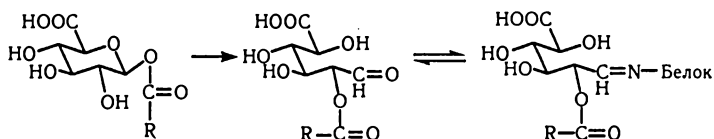
I Миграция ацильной группы



- а) О-ацилглюкуронид; б) О-ацилглюкуронид (β -изомер);
в) О-ацилглюкуронид (β -изомер); г) О-ацилглюкуронид (β -изомер)

II Необратимое связывание с белками

1. Образование иминов



2. Нуклеофильное замещение

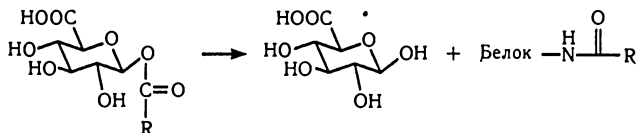


Рис. 8.8. Механизмы миграции ацильной группы и связывания глюкуронидов с альбумином

Наиболее важным процессом, запускающим последующие реакции является миграция ацильной группы, заключающаяся в перемещении агликаона из 1-го положения во 2, 3 или 4-е, содержащие гидроксильную группу. Такая перегруппировка сохраняет β -конфигурацию глюкуронидов. Однако делает их недоступными для действия β -глюкуронидазы. Образование атипичных глюкуронидов имеет широкие межвидовые колебания [362].

Скорость миграции ацилов зависит от структуры агликаона, так же как и их стабильность. При физиологических или незначительно щелочных значениях pH миграция и гидролиз ацилглюкуронидов проходит довольно интенсивно. В то же время анализ полученных данных *in vivo* некоторые авторы [341] рекомендуют интерпритировать весьма осторожно, так как в этом случае может наблюдаться гидролиз ацилглюкуронидов, который может быть вызван другими ферментами (эстеразами).

Предположено несколько механизмов необратимого связывания ацилглюкуронидов белками плазмы (позиция II, рис. 8.8). Во-первых, это возможность раскрытия кольца глюкуроновой кислоты с последующей перегруппировкой Амадури. Раскрытие

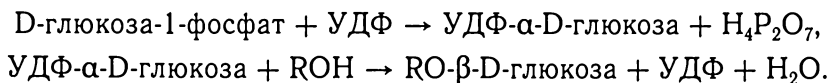
кольца сопровождается образованием альдегидной группы глюкуроновой кислоты, способной взаимодействовать с нуклеофильными остатками аминокислот (особенно лизина) с формированием имина. Несмотря на обратимость процесса образования соответствующих иминов они могут в дальнейшем восстанавливаться до более стабильного продукта реакции (1-амино-2-кетопроизводного).

Во-вторых, теоретические предпосылки предполагают [363] вовлечение в процесс связывания с белками ацилглюкуронидов нуклеофильного замещения.

В последнее время подтверждено [364], что в организме человека и экспериментальных животных имеет место образование ацилглюкуронидов, где в качестве субстратов может выступать эндогенное вещество (билирубин).

Конъюгаты лекарственных средств могут содержать и некоторые другие углеводы (глюкозу, галактозу, ксилозу). В частности, в живых организмах происходит синтез билирубин- β -D-ксилозида [365], ретиноилгалактозида [366], различных N-ацетиламиногликозидов стероидов [367] и β -D-глюкозида билирубина [368]. Наиболее распространены ферменты, катализирующие образование таких соединений в организме беспозвоночных животных и растений. В этом отношении особое место занимает реакция конъюгации ксенобиотиков с глюкозой, заменяющая в растительных и низших животных организмах глюкуроновую конъюгацию [365, 367, 368]. Среди млекопитающих гликозидная конъюгация встречается в организмах кролика, мышей, крысы и человека [368].

Механизм образования β -D-глюкозидов окончательно не выяснен. Однако по аналогии с глюкуронидами можно представить, что он включает две стадии:

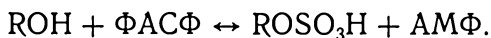
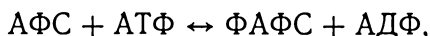
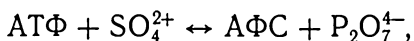


Реакции катализируются соответственно УДФ-глюкозопирофосфорилазой и УДФ-глюкозилтрансферазой. УДФ-глюкозилтрансфераза млекопитающих локализована в основном

в микросомах печени и в незначительном количестве — в почках и тонком кишечнике кроликов [369]. Оптимумы pH печеночного и почечного ферментов кролика соответственно равны 7,0 и 8,0. Оба фермента обладают субстратной специфичностью и их относительная активность значительно меньше UGT.

8.4.2. СУЛЬФОТРАНСФЕРАЗА И ФОСФОТРАНСФЕРАЗА

Для синтеза углеводных конъюгатов необходимы уридиндифосфатные коферменты, а для синтеза эфирсульфатов, сложных эфиров фосфорной кислоты и метиловых производных ксенобиотиков — аденозиновые. В метаболизме ксенобиотиков наиболее часто участвуют арилсульфаты, алилсульфаты и сульфаматы. Сульфатные конъюгаты присутствуют тогда, когда образуются следующие связи: C—O—S, N—S, N—C—S, P—O—S, S—S. Синтез сульфатов протекает в три этапа:



В результате первых двух реакций получается аденозин-3'-фосфат-5-фосфосульфат (ФАФС), для которого промежуточными продуктами будут две молекулы АТФ и неорганический сульфат. Указанные реакции катализируют соответственно АТФ-сульфурилаза, АФС-киназа и сульфотрансфераза. АТФ-сульфурилаза и АФС-киназа относятся к растворимым ферментам и локализованы в цитозоле клеток. Сульфотрансфераза обнаружена в растворимой фракции клеток, эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи [370]. Растворимая сульфотрансфераза катализирует образование эфиров серной кислоты в случае следующих субстратов: фенолов, эстрогенов, андростенолона,

тестостерона, диоксикортикостерона, спиртов, ариламинов, лактозы и аскорбиновой кислоты. Мембраносвязанный фермент участвует в синтезе хондриотин-4-сульфата, гепарина и гепарансульфатов, цереброзитсульфата.

Наиболее изучены конъюгаты сложных эфиров феноловых соединений и первичных спиртовых групп стероидной боковой цепи. Согласно [371], синтез арилсульфатов предохраняет организм от токсического действия фенольных продуктов, так как в процессе жизнедеятельности кишечной микрофлоры происходит их образование. Структурное сходство фенолов, поступающих в организм извне, делает их субстратами соответствующих сульфотрансфераз.

Физиологическая роль стероидных сульфатов окончательно не выяснена. Несомненно, синтез таких метаболитов не всегда способствует их быстрому выведению из организма. Такое заключение основано на том, что при введении крысам меченого кортизон-21-сульфата он не выводится с мочей. Однако в желчи обнаружен метаболит $3\alpha-(\beta\text{-D-глюкопираноуронозидо})\text{-}17\alpha\text{-окси-}21\text{-сульфоокси-}5\alpha\text{-прегнана-}11, 20\text{-дион}$ [372]. Очевидно, образование стероидных сульфатов выполняет какую-то регуляторную роль в обмене гормонов, возможно депонирующую, как это имеет место в семенниках.

Спиртовая сульфотрансфераза — уникальный фермент, катализирующий метаболизм ксенобиотиков. К естественным относятся только один фермент, который в яйце кур образует изопропилсульфат. Однако сульфоконъюгация чужеродных спиртов в организме млекопитающих встречается довольно часто [373]. Аналогичный процесс наблюдается и в опытах *in vitro*. Фермент также присутствует в печени различных видов земноводных и рыб. Из организма жабы (*Xenopus laevis*) выделен фермент и отделен от желчной алкогольсульфаттрансферазы.

В организме человека обнаружено [374] три семейства сульфотрансфераз (SULT1, SULT2, SULT3) и около 40 изоферментов. Все они кодируются, по крайней мере, 10 генами. Наибольшую роль в сульфатировании лекарственных средств и их метаболитов

играют изоферменты *SULT1*, из которых особенно важными считаются [375] *SULT1A1* и *SULT1A3*.

Изоферменты *SULT1* локализованы, в основном, в печени, легких, селезенке, плаценте, головном мозге, тонком и толстом кишечнике, а также в лейкоцитах. Они имеют молекулярную массу около 34 кД и состоят из 295 аминокислотных остатков. Ген *SULT1* локализован в 16 хромосоме, локусе 16p11.2 [376].

Большинство производных простых фенолов образуют сульфаты посредством каталитического действия *SULT1A1* (термостабильная изоформа). Ее маркерным субстратом является 4-нитрофенол. К эндогенным субстратам *SULT1A1* относится 17 β -эстрадиол, а к экзогенным — такие лекарственные препараты как миноксидил, ацетаминофен, морфин, салициламид, изадрин и др. [377]. Отметим, что сульфатирование миноксидила приводит к образованию его активного метаболита, что бывает довольно редко в реакциях синтеза метаболических превращений биологически активных веществ. Термолabile изоформа фермента (*SULT1A3*) катализирует реакции сульфатирования фенолов моноаминов: дофамина, серотонина, норадреналина. Маркерным субстратом фермента является дофамин.

Изоферменты *SULT2* обеспечивают сульфатирование дигидроэпиандростерона, эпиандростерона, андростерона. Экзогенными субстратами этой изоформы ферментов являются полициклические углеводороды, содержащие соответствующие акцепторные группы (5-оксиметилхризен, 7,12-дигидрооксиметилбенз[а]антрацен, N-окси-2-ацетиламинофлуорен).

Ациклические ариламиды относятся к субстратам изоферментов *SULT3*, катализирующим N-сульфатирование [378]. Существует еще одна точка зрения на природу сульфотрансфераз [370]. Считается, что их субстратная специфичность зависит от того, в какой форме (окисленной или восстановленной) находится фермент (табл. 8.15). Если фермент находится в окисленной форме, максимальная его активность проявляется к субстратам, содержащим электроноакцепторные заместители в бензольном кольце фенолов. В этом случае существует удовлетворительная

корреляция между константами Гаммета и максимальными скоростями образования продуктов реакции. Для электронодонорных заместителей субстратов наблюдается обратная картина. В то же время восстановленная форма фермента катализирует с большей скоростью соединения, имеющие электронодонорные заместители. Следовательно, один и тот же фермент в зависимости от состояния может превращать различные по химической природе и физико-химическим свойствам субстраты.

Таблица 8.15

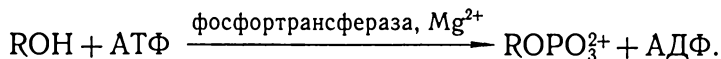
Относительная максимальная скорость образования фенолсульфатов, катализируемая фенолсульфотрансферазой печени крыс

Заместитель фенильного кольца	Константа заместителя σ_p	$V_{\text{макс}}$ (относительная)	
<i>n</i> -NO ₂	+ 1,27	8,6	3,5
<i>m</i> -Cl	+ 0,37	6,4	3,7
<i>n</i> -Cl	+ 0,24	5,6	2,3
H	0	4,0	7,5
<i>m</i> -NH ₂	- 0,04	2,1	6,2
<i>n</i> -OCH ₃	- 0,11	3,0	7,2
<i>n</i> -CH ₂ CH ₂ NH ₂	- 0,45	1,0	6,3

Фармакогенетические аспекты SULT еще не нашли должного отражения в научной литературе, однако они несомненно представляют определенный интерес [379] уже на современном этапе.

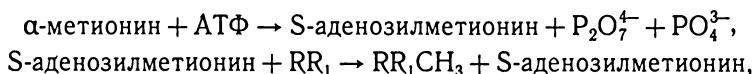
Несмотря на то, что в тканях животных находится гораздо больше фосфатов, чем сульфатов, все же сложные эфиры фосфорной кислоты в виде конъюгатов ксенобиотиков встречаются очень редко. Среди млекопитающих такие конъюгаты образуются в организме людей и собак [380]. Возможность синтеза канцерогенного фосфатного конъюгата 2-ацетиламинофлуорена ферментами печени крыс была показана Кингом и Филлипсом [381].

Фосфорилирование субстратов осуществляется при участии АТФ и Mg^{2+} :



8.4.3. МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ

Процессы метилирования аминов, фенолов и тиоловых соединений характерны для многих живых организмов. Источником метильных групп служит S-аденозилметионин, который образуется из α-метионина:



где $R_1 = OH; SH; NH_2$.

Катализируют процесс неспецифические метилтрансферазы. В большинстве случаев образование N- и O-метиловых конъюгатов характерно для эндогенных субстратов. В то же время S-метилирование — основная реакция метаболизма таких чужеродных соединений, как меркаптоуксусная кислота, метил- и этил-меркаптаны, β-меркаптоэтанол, 2,3-димеркаптопропанол и тиюрацил.

Сульфометилтрансфераза локализована в микросомальной фракции печени, почек и легких [382].

Интересна точка зрения [383] на роль реакций метилирования ксенобиотиков в общем процессе метаболизма чужеродных соединений. В результате этой реакции, образующийся продукт не становится более полярным, а отсюда легко экскретирующимся. Тем не менее значение такого процесса и особенно S-метилирования велико. Он дает клеткам способность блокировать весьма реакционноспособные сульфгидрильные группы [384].

Отдельным представителем сульфометилтрансфераз является тиопурин-S-метилтрансфераза (TPMT), катализирующая реакцию метилирования производных тиопурина. Она относится к основному пути биотрансформации цитостатиков из группы антагонистов пурина: меркаптопурина, 6-тиогуанина, азотиприна. TPMT локализована в цитоплазме клеток кроветворения [385], имеет молекулярную массу 28 кД, количество, входящих в ее состав аминокислотных остатков составляет 245. Ген TPMT локализован в 6 хромосоме, локусе 6q22.3.

В начале 80-х годов прошлого столетия было установлено, что около 89 % обследованных пациентов имели высокие значения активности фермента, 11 % — промежуточную, а у 0,3 % она была низкой либо вообще отсутствовала. Так впервые был описан генетический полиморфизм TPMT [386]. Затем было показано, что у людей с низкой активностью фермента наблюдается повышенная чувствительность к производным тиопурина, которая проявляется опасными для жизни гематотоксическими (лейкопения, анемия) и гепатотоксическими эффектами. Объясняется это следующим образом. В условиях низкой активности TPMT, например, в случае с 6-меркаптопурином, его метаболизм идет по другому, альтернативному пути, с образованием высокотоксичного продукта реакции (6-TGN). Чем выше концентрация 6-TGN в плазме крови, тем ниже активность TPMT в эритроцитах пациентов и тем более выражены побочные эффекты [387].

Сейчас уже известно, что низкая активность TPMT наследуется по аутосомному рецессивному типу, причем гомозиготы проявляют низкую активность, а гетерозиготы — промежуточную. Наиболее распространенной мутацией гена TPMT среди европейского населения является TPMT*3A (Ala154Thr). Определены также еще две мутации гена фермента — TPMT*2 (Ala80Pro) и TPMT*8 (Arg215Hys).

Повышенная чувствительность к тиопуринам отмечается не только у гомозигот, но и у гетерозигот по мутантным аллелям гена TPMT. Таким образом, для обеспечения безопасности проводимой химиотерапии, перед назначением тиопуринов необхо-

димо определять активность ТРМТ в эритроцитах пациента (фенотипирование фермента) или определять генотип с помощью ПЦР (генотипирование фермента, с последующей коррекцией режима введения препарата). Считается, что ТРМТ — идеальный ген в качестве кандидата для тестов, основанных на определении ДНК, которые вскоре могут стать рутинным скринингом популяции восприимчивых пациентов накануне лекарственной терапии.

Наряду с метилированием фенолов может происходить метоксилирование производных бензола, не содержащих акцепторных групп для метилтрансфераз. Конечными продуктами оксиметилирования, как и в случае метилирования фенолов, являются метоксильные метаболиты. Оксиметилирование фенольного кольца 1,4-бенздиазепинов [388—390] и 2-аминобензофенонов [331, 332] встречается довольно часто, однако в незначительных (следовых) количествах. Природа фермента, катализирующего этот процесс — не известна.

8.4.4. АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ

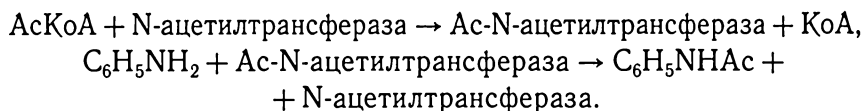
Амины в организме некоторых видов животных и человека подвергаются ацетилированию. Процесс биологического ацетилирования широко распространен в живой природе, а соединения, имеющие гидроксильные и сульфгидрильные группы, служат субстратами действия N-ацетилтрансфераз. Чужеродные вещества ацетируются только при наличии в их молекуле NH_2 -группы. Это могут быть ароматические амины ($\text{C}_6\text{H}_5\text{—NH}_2$), α -аминокислоты ($\text{R—CH}(\text{COOH})\text{NH}_2$), гидразины (R—NH—NH_2) и сульфонамиды ($\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_2\text{—NH}_2$).

Ацетилирование аминов — многостадийный процесс, состоящий из следующих этапов:

— образование ацетильной группы (Ac) за счет синтеза пирувата из ацетоуксусной кислоты. Значительная роль здесь принадлежит субстратам окисления цикла трикарбоновых кислот;

— синтез ацетил-КоА, который осуществляется через окислительное декарбоксилирование пирувата и катализируется мультиферментным комплексом пируватдегидрогеназой;

— ацетилирование аминов N-ацетилтрансферазами. Данные ферменты можно отнести к ацетокиназам, так как они переносят ацетильную группу от ацетил-КоА к субстратам. Изучение кинетических свойств N-ацетилтрансферазы на частично перфузируемой печени кролика показало, что реакция происходит по так называемому упорядоченному Биби механизму [233]:



Реакции ацетилирования осуществляются в гепатоцитах, селезенке, легких, пищеварительном тракте животных, а также микрофлорой и форменными элементами крови [20, 83, 84, 391, 392].

Выделено два изофермента N-ацетилтрансферазы: NAT1 и NAT2. Первая изоформа фермента, катализирует реакции ацетилирования небольшого числа ариламинов. Основным ферментом ацетилирования является NAT2, состоящий из 290 аминокислотных остатков и имеющего молекулярную массу 33 кД. Локализуется NAT в цитоплазме клеток. Ген NAT2 расположен в 8 хромосоме, локусе 8p23.1—p21.3. Субстратами NAT2 являются все лекарственные средства, содержащие аминогруппу или те, у которых нитрогруппа в реакциях восстановления трансформируется в аминогруппу. К прямым субстратам относятся: гидралазин, прокаинамид, сульфадиазин, аминоглутетемид, изоиназид, ПАСК, ПАБК, к опосредованным — нитразепам, клоназепам и др. [393].

В литературе постоянно описываются новые варианты аллелей NAT. Методом полиморфизма длины рестрикции фрагментов ДНК идентифицированы 15 аллелей NAT2 гена для изониазидного полиморфизма [392—395]. У человека вариабельна также экспрессия NAT1 — описано 9 аллелей (табл. 8.16).

Таблица 8.16

Мутантные аллели N-ацетилтрансферазы [392—395]

Аллель	Позиции замены в нуклеотидах	Изменения в аминокислотной последовательности	Фенотип
NAT1			
NAT1*3	C ₁₀₉₅ A	неизвестно	неизвестный
NAT1*4	дикий тип		нормальный
NAT1*5	G ₃₅₀ C; G ₃₅₁ C; G ₄₉₇ C; G ₄₉₈ C; G ₄₉₉ C; A ₈₈₄ G; Δ ₉₇₆ ; Δ ₁₁₀₅	R ₁₁₇ T; R ₁₆₆ T; E ₁₆₇ Q	неизвестный
NAT1*10	T ₁₀₈₈ A; C ₁₀₉₅ A		ускоренный
NAT1*11	C ₃₄₄ T; A ₄₀ T; G ₄₅₉ A; T ₆₄₀ G; Δ9bp (участок 1066—1088)	S ₂₁₄ A	неизвестный
NAT1*14	G ₅₆₀ A		замедленный
NAT1*15	C ₅₅₉ T	R ₁₈₇ Q	замедленный
NAT1*16	3bp вставка (положение 1091)	R ₁₈₇ Stop неизвестно	неизвестный
NAT1*17	C ₁₉₀ T	R ₆₄ W	замедленный
NAT2			
NAT2*4	нет		ускоренный
NAT2*5A	T ₃₄₁ C; C ₄₈₁ T	I ₁₁₄ T	замедленный
NAT2*5B	T ₃₄₁ C; C ₄₈₁ T; A ₈₀₃ G	I ₁₁₄ T; K ₂₆₈ R	замедленный
NAT2*5C	T ₃₄₁ C; A ₈₀₃ G	K ₂₆₈ R	замедленный
NAT2*6A	C ₂₈₂ T; G ₅₉₀ A	R ₁₉₇ Q	замедленный
NAT2*6B	G ₅₉₀ A	R ₁₉₇ Q	замедленный
NAT2*7A	G ₈₅₇ A	G ₂₈₆ E	замедленный
NAT2*7B	C ₂₈₂ T; G ₈₅₇ A	G ₂₈₆ E	замедленный
NAT2*12A	A ₈₀₃ G	K ₂₆₈ R	нормальный
NAT2*12B	C ₂₈₂ T; A ₈₀₃ G	K ₂₆₈ R	нормальный
NAT2*13	C ₂₈₂ T		нормальный
NAT2*14A	G ₁₉₁ A	R ₆₄ E	замедленный
NAT2*14B	G ₁₉₁ A; C ₂₈₂ T	R ₆₄ E	замедленный
NAT2*17	A ₄₃₄ C	Q ₁₄₅ P	неизвестный
NAT2*18	A ₈₄₅ C	K ₂₈₂ T	неизвестный

Примечание: Данные изменения аминокислотной последовательности представлены однобуквенным сокращением (см. приложение 1)

Установлено, что NAT1*14 и NAT1*15 продуцируют дефектный NAT1 белок, который задерживает метаболизм NAT1-зависимых субстратов *in vivo* и *in vitro*; наоборот, NAT1*10 — вариант ассоциируется с повышенной активностью NAT1 и возрастанием риска возникновения рака кишечника и мочевого пузыря [394].

Исследования показали, что полиморфизм NAT2 связан с комбинацией по крайней мере восьми точечных мутаций в пределах региона NAT2. Пять мутаций NAT2 связаны с заменой одной аминокислоты. Из них четыре приводят к уменьшению ацетилирующей способности (медленному ацетиляторному полиморфизму) в гомозиготном рецессивном состоянии (табл. 8.16).

Установлено, что NAT2*4 и редкая NAT2*2 аллели определяют быстрое ацетилирование, а *5B, *6B и более редкие аллели *5A, *5C, *6B, *7B, *14B кодируют медленное ацетилирование.

Ацетилирующая способность гомозигот с быстрым типом ацетилирования: wild-tipe/wild-tipe (wt/wt) значительно выше, чем у гетерозигот: wild-tipe/mutation (wt/mut). Следует отметить, что медленные ацетиляторы значительно отличаются друг от друга. Так, *6A, *7B и *13 аллели кодируют ферменты, обладающие меньшей ацетилирующей активностью, чем аллели *5 группы. Предполагается, что с аллелями группы *5 связано уменьшение количества NAT2 фермента в печени из-за нарушения процесса трансляции, а *6A аллель обеспечивает синтез нестойкого фермента [392, 394].

В различных человеческих популяциях частота встречаемости аллелей ускоренного метаболизма NAT2*4 разная: среди японцев — 68,6 %, китайцев — 51 %, а среди европейцев — 23,4 %. Такие аллели медленного метаболизма как NAT2*14A и *14B встречаются исключительно у представителей негроидной расы.

Гомозиготные мутанты обладают низкой способностью ацетилировать субстраты NAT2, поэтому фармакотерапия у таких гомозигот должна быть направлена на снижение дозы лекарственного средства и требует контроля за возможными нежелательными эффектами. В литературе [393] освещены проблемы

применения тех или иных лекарственных средств при различных заболеваниях с учетом вариантов генотипа NAT2. Так, исследования показали, что назначение сульфасалазина больным СКВ может приводить к различным эффектам. Больные, у которых наблюдался хороший терапевтический эффект, были быстрыми ацетиляторами. В то же время, у медленных метаболизаторов отмечали неэффективность такого лечения. На основании полученных данных было сделано заключение о связи NAT2 полиморфизма с различной восприимчивостью больных СКВ к сульфасалазину.

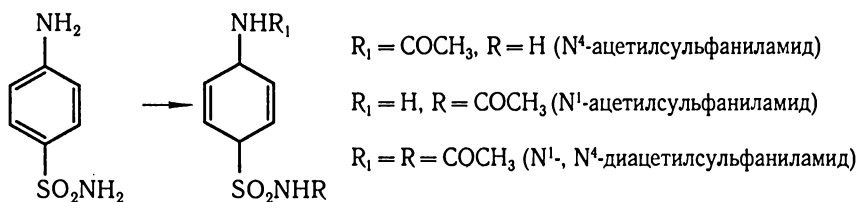
Интересные результаты были получены при изучении генотипа NAT2 у больных контактной аллергией. Среди таких больных преобладали быстрые ацетиляторы. Исходя из этого, сделано предположение о том, что ускоренное ацетилирование может повышать сенсibilизацию организма. Не исключается, что тип фермента NAT2 может служить маркером повышенной чувствительности к контактными аллергенам.

Полиморфизм NAT2 обуславливает также разнообразие метаболизма потенциальных канцерогенов, что служит одной из причин предрасположенности к развитию химически-индуцированных нежелательных эффектов. К настоящему времени имеются многочисленные публикации, в которых указывается на взаимосвязь между типом ацетилирования и повышенным риском развития злокачественных опухолей (рак мочевого пузыря, пищевода, прямой кишки, легких, молочной железы). Данные некоторых исследований противоречивы, но, в целом, они позволяют заключить, что определенные генотипы ферментов лекарственного метаболизма в сочетании с другими факторами (характер питания, вредные привычки, профессиональные факторы) играют существенную роль в канцерогенезе.

Тип ацетилирования определяют как методами фенотипирования, так и генотипированием NAT2. В качестве маркерных субстратов ацетилирования широко используются дапсон и сульфадимезин. Отношение концентрации моноацетилдапсона к концентрации дапсона в плазме крови через 6 часов после введения

препарата менее 0,35 характерно для медленных ацетиляторов, а более 0,35 — для быстрых ацетиляторов. В случае если в качестве маркерного субстрата используется сульфадимезин, наличие менее 25 % сульфадимезина в плазме через 6 часов и менее 70 % в моче, собранной через 5—6 часов после введения препарата говорит о фенотипе медленного ацелирования.

Определенный вклад в общий процесс ацелирования вносит и микрофлора кишечника [83, 84, 264]. Эта реакция является основной в метаболизме ароматических аминов, сульфамидов и некоторых ароматических аминокислот. Ацелирование сульфамидов микроорганизмами приводит к образованию N¹-, N⁴-ацелиловых и диацелиловых производных:

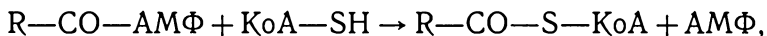


Особенно активными штаммами, ацелирующими сульфамиды, являются *E.coli*, *Str. Faecalis* и *Lactobacillus acidophilus*.

Процессы ацелирования и гидролитического расщепления амидов (деацелирования, раздел 8.3) обратимы, и образование соответствующих продуктов реакции зависит от конкуренции между этими двумя группами ферментов микроорганизмов. Например, микроорганизмы пищеварительного тракта крыс гидролизуют производные ацетанилида. Наличие заместителя в *пара*-положении субстрата приводит к различной степени образования деацелильных метаболитов. Гидроксильный или алкильный заместители препятствуют отщеплению ацетила. Введение ароматической группы (*n*-бензоксиацетанилид), галоида (*n*-хлорацетанилид) или гидроксильной, или метильной групп способствует уменьшению их сродства к соответствующим амидазам микроорганизмов [84].

8.4.5. ФЕРМЕНТЫ, КАТАЛИЗИРУЮЩИЕ РЕАКЦИИ КОНЬЮГАЦИИ ЛЕКАРСТВ С АМИНОКИСЛОТАМИ И ПЕПТИДАМИ

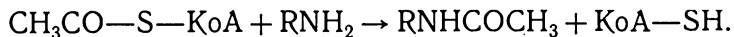
Ароматические и некоторые алифатические карбоновые кислоты конъюгируют в организме животных с различными аминокислотами. Наиболее часто вступает в пептидную конъюгацию глицин. Продукты такой реакции называются гиппуровыми кислотами. Образование гиппуровых кислот происходит в несколько стадий:



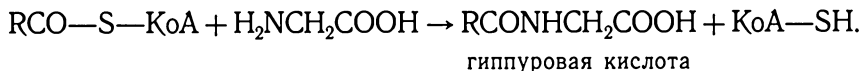
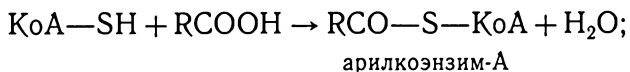
На первых стадиях участвуют АТФ и КоА, активирующие субстрат ($R-COOH$). Эти процессы катализируют ацилсинтетатаза и ацилтиокиназа соответственно. Затем активированный субстрат взаимодействует с глицином. Ферментом, участвующим в этой реакции, является ацил-КоА-глицин N-ацилтрансфераза.

Таким образом, образование гиппуровой кислоты напоминает синтез эфиров в том отношении, что происходит активация карбоновой кислоты в форме соответствующего ацил-КоА, который является непосредственным ацилирующим агентом в реакции, катализируемой ацил-КоА-трансферазой.

Сравнивая реакции ацетилирования, представленные в разделе 8.4.4 и образования гиппуровых конъюгатов можно отметить, на первый взгляд, их идентичность. Это объясняется, прежде всего, участием в этом процессе ацил-КоА. Тем не менее, существует одна существенная разница, определяющая обе реакции как различные. В первом случае, ароматические амины ацетируются непосредственно ацил-КоА:



Во втором случае, KoA взаимодействует с чужеродными карбоновыми кислотами, образуя арил-KoA, который затем соединяется с глицином, образуя гиппуровую кислоту:



В силу того, что первоначально из мочи лошади был выделен Либихом конъюгат N-бензоилглицин, он получил название гиппуровой кислоты.

Конъюгация ксенобиотиков с глицином осуществляется в митохондриях и цитозоле клеток печени и особенно интенсивно в почках. В некоторых патологических ситуациях аналогичная реакция отмечена для желчных кислот [396]. Количество химических веществ, вовлекающихся в глициновую конъюгацию — незначительное, так как ограничено определенным классом соединений: ароматические, гетероароматические, арилукусусные, арилоксиукусусные кислоты и производные коричной кислоты. Даже в таком случае помехой на пути образования гиппуровых кислот в реакциях синтеза являются заместители в ароматических или гетероциклических кольцах ксенобиотиков. Так, в молекуле бензойной кислоты заместители во втором положении оказывают значительно большее влияние на формирование соответствующих конъюгатов, чем в положениях 3 и 4. В то же время для арилукусусных кислот заместители у углеродного атома, сопряженного с карбонильной группой и во втором положении фенила являются определяющими в их субстратной специфичности [397].

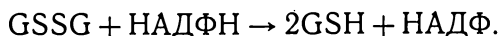
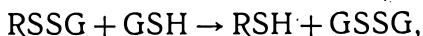
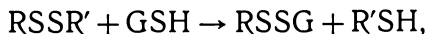
Конъюгация глицина с ксенобиотиками отмечена в организме млекопитающих, птиц, земноводных, пресмыкающихся и насекомых. Когда у животных организмов отсутствует ацил-KoA-глицин

N-ацилтрансфераза, для них характерна пептидная конъюгация с участием аргинина, орнитина и глутамина [203, 235]. Индол-3-уксусная кислота тоже образует глутаминовый конъюгат в организме человека и некоторых приматов. Кроме того считают [74], что у людей, крыс, кроликов и цыплят *пара*-аминосалициловая кислота конъюгирует с глутамином. Ароматические, гетероциклические и арилукусусные кислоты в организме птиц и рептилий образуют конъюгаты с участием орнитина. При этом такая возможность достигается за счет способности азотов, во втором и пятом положениях орнитина, акцептировать ацильную группировку [396, 397].

Намного реже в живых организмах встречаются конъюгаты ксенобиотиков с дипептидами. Производные хиной и кинуриновой кислот формируют конъюгаты с глицилглицином и глицилтаурином в организме кошек, а 3-феноксibenзойная кислота — с глицилвалином в организме уток [396].

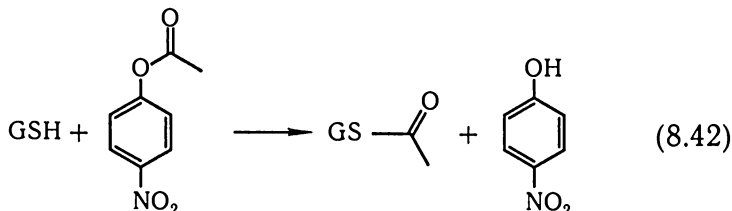
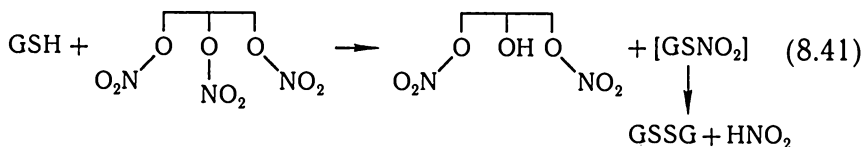
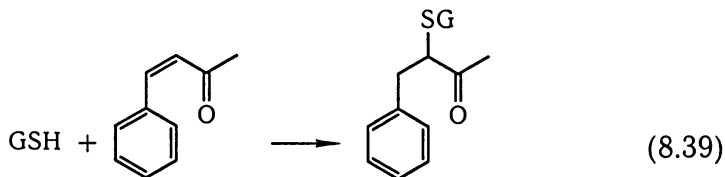
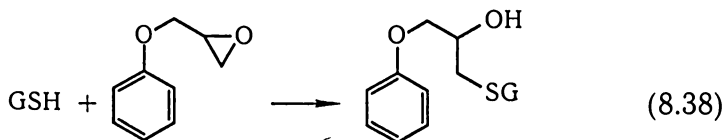
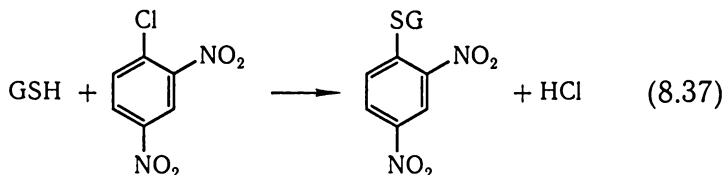
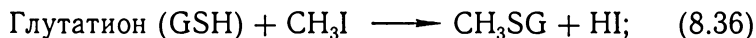
Многие ксенобиотики выводятся из организма экспериментальных животных и человека в виде меркаптуровых кислот. Они образуются в результате взаимодействия лекарств с глутатионом. Структура глутатиона (GSH), широко распространенного в биологических системах трипептида (γ -L-глутамил-L-цистеинглицин), была установлена в 1929 г. Гопкинсом. Хотя GSH после его открытия приписывалось множество биохимических функций, известно относительно немного процессов, в которых он выступает в роли кофермента. К числу наиболее хорошо изученных относится глиоксилазная реакция.

Наиболее важной метаболической функцией GSH является поддержание сульфгидрильных цистеиновых групп в белках в восстановленном состоянии благодаря следующим реакциям:



Первая из реакций — химическая, т. е. имеет спонтанный характер, а две остальные — ферментативные.

Глутатионовая конъюгация основана на реакционной способности GSH взаимодействовать с ксенобиотиками, которые содержат электрофильные углеродные атомы, в следующих процессах:



Катализирует реакции глутатион-S-трансфераза. Фермент устраняет галогены (8.36), (8.37). Аналогично происходит замещение лабильных нитрогрупп или сульфатов. Субстратами для глутатион-S-трансферазы служат ареновые окислы, алифатические эпоксиды (8.38) или вещества с ненасыщенными связями (8.39). В реакциях с тиоцианатами (8.40) GSH выступает в качестве соединения, атакующего электрофильную серу. Фермент в некоторых случаях выполняет роль «нитратэфирной редуктазы» (8.41). Здесь GSH взаимодействует с электрофильным азотом. Кроме того, глутатион-S-трансфераза катализирует классическую нуклеофильную реакцию, в результате которой из *n*-нитрофенилацетата образуется соответствующий тиоэфир (4.42). Впоследствии тиоэфир претерпевает ряд превращений. От него отщепляется γ -глутаминовая кислота, а затем глициновый остаток. Оставшийся тиоэфир цистеина ацетируется КоА с образованием меркаптуровой кислоты, экскретирующей с мочой.

По мере образования и выделения меркаптуровой кислоты при действии различных ксенобиотиков в тканях происходит быстрое снижение содержания GSH. Например, концентрация GSH в печени мышей падает при введении им доксорубина и ацетаминофена [398]. Все эти данные послужили основанием для использования синтетического GSH для защиты от повреждений. В частности, глутатион оказывал защитный эффект при воздействии бромбензола и парацетамола и оксидов азота [399]. Он значительно ослаблял мутагенную активность 2,3-дибромпропана и 2,3-дибромпропионовой кислоты и уменьшал канцерогенное действие полициклических углеводородов.

Скорость образования глутатионовых конъюгатов определяется активностью глутатион-S-трансферазы и зависит от уровня GSH в организме. Фермент локализован в эндоплазматической сети и цитозоле различных органов и тканей [396] и обладает низкой специфичностью. Природа субстрата, к которому фермент проявляет наибольшую активность, легла в основу его начальных названий: глутатион-S-алкилтрансфераза,

глутатион-S-эпоксидтрансфераза, глутатион-S-арилтрансфераза [84]. Однако такая классификация не в полной мере отражает свойства ферментов и впоследствии была заменена новой [400].

По идентичности аминокислотного состава у млекопитающих выделяют 6 классов глутатион-S-трансферазы (GST): α , μ , κ , θ , π , σ . В организме человека в основном экспрессируются GST классов μ (GSTM), θ (GSTT) и π (GSTP). Наибольшее значение из перечисленных изоформ в метаболизме ксенобиотиков имеют GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4 и GSTM5. Ген GSTM локализован в 1 хромосоме, локусе 1p13.3. Экспрессируется GSTM1 в печени, почках, надпочечниках, желудке. Незначительная экспрессия отмечена в скелетных мышцах, миокарде и совсем она отсутствует в плодной печени, фибробlastах, эритроцитах, лимфоцитах и тромбоцитах. В то же время GSTM2 («мышечная»), подвержена экспрессии аналогично GSTM1, но обнаруживается и в мышцах, а «мозговая» (GSTM3), кроме того — и в нервной ткани.

Важная роль в инактивации канцерогенов принадлежит GSTM1. Косвенным подтверждением этого является достоверное увеличение частоты злокачественных заболеваний среди носителей нулевых аллелей гена GSTM1, у которых отсутствует экспрессия этого фермента [401]. На основании полученных данных был сделан вывод о невозможности организмов носителей нулевых аллелей GSTM1 инактивировать электрофильные вещества. Распространенность нулевой аллели среди европейцев составляет 40—45 %, а у негроидной расы — 60 % [402].

Идентифицировано две аллели GSTM1 (GSTM1*A и GSTM1*B), которые различаются друг от друга наличием в 172 положении молекулы, соответственно, остатков аспарагина и лизина. Оба фермента обладают идентичной активностью [403].

Субстратами GSTT1 являются такие незначительные по молекулярной массе органические вещества, как дихлорметан и окись этилена. Что касается GSTP1, то он экспрессируется в печени и тканях гематоэнцефалического барьера и участвует

в инактивации пестицидов и гербицидов используемых в сельском хозяйстве. Его ген локализован в 11 хромосоме, локусе 11q13. Для фермента характерен генетический полиморфизм. В отличие от GSTP1*A, у носителей мутаций гена GSTP1*B (Ile104Val) и GSTP1*C (Ile104Val, Ala113Val) активность фермента повышена.

У пациентов, носителей аллелей GSTP1*B/C под действием пестицидов и гербицидов в 3—4 раза чаще возникает болезнь Паркинсона [396]. Авторы предполагают, что механизм этого явления заключается в более интенсивном синтезе соответствующих конъюгатов в структурах гематоэнцефалического барьера с образованием нейротоксичных продуктов реакции. Интересные данные были получены при изучении [404] чувствительности к ацетаминифену трансгенных линий мышей. Оказалось, что применение этого вещества не только не вызывает более выраженного гепатотоксичного эффекта, но и по сравнению с контрольными мышами выраженность поражения печени оказывалась меньшей. Исходя из общего представления о роли GSTP в общем процессе метаболизма ксенобиотиков этот факт трудно объяснить.

8.4.6. АЛЬТЕРНАТИВНОСТЬ ПУТЕЙ РЕАКЦИЙ КОНЪЮГАЦИИ ЛЕКАРСТВ В КЛЕТКЕ

Среди ксенобиотиков редко встречаются структуры, которые в живых организмах претерпевают только один тип превращений и тем более в одном участке молекулы. Обычно такие вещества содержат несколько функциональных групп, поэтому подвергаются одновременному действию ферментов на различных участках его молекулы или нескольких ферментов на один участок. Последний случай особенно интересен в связи с обсуждаемой проблемой, и в котором всегда возникает вопрос почему при наличии значительного числа конъюгационных

механизмов, все же предпочтение отдается одному из них? Существует [405], по крайней мере, три фактора, которыми можно объяснить такое явление. На примере синтетических реакций, где в качестве субстратов использовались производные арилуксусной кислоты было показано, что структурные особенности соединений играют более важную роль в процессах глюкуронизации и образования пептидных конъюгатов, чем вид экспериментальных животных. В то же время тип пептидной конъюгации всецело зависит только от вида животных.

Для объяснения преимущественного образования одного из конъюгатов в организме крыс были использованы методические приемы, дающие возможность одновременного определения синтезируемых глюкуроновых и пептидных конъюгатов в опытах *in vitro* и *in vivo*. Параллельно оценивались некоторые физико-химические свойства субстратов и их способность связываться с микросомами (участок синтеза глюкуронидов) и митохондриями (участок синтеза пептидных конъюгатов). Данные таких исследований [397] представлены в таблицах 8.17 и 8.18.

Таблица 8.17

Скорости связывания арилуксусных кислот с митохондриями и микросомами печени крыс и образования в них соответствующих конъюгатов

Субстрат (кислота)	Митохондрии		Микросомы		<i>in vivo</i> синтез
	Связывание ¹	Синтез ²	Связывание	Синтез	
Фенилуксусная	4	89	5	0	Аминокислота
1-нафтилуксусная	1	3	10	15	Аминокислота Глюкуроновая кислота
2-фенилпропионовая	0,1	0	15	14	Глюкуроновая кислота
Дифенилуксусная	0	0	13,5	28	Глюкуроновая кислота

Примечание: ¹ — ρ mol/мг белка

² — n mol продукта за 30 мин.

Таблица 8.18

Содержание в моче кошек и крыс конъюгатов фенолов

Субстрат (кислота)	pK_a	Процент ионизации (pH 7,4)	$\text{Log } P$	Растворимость в липидах (относительная)	<i>in vivo</i> синтез
Фенилуксусная	4,32	99,92	1,43	1,0	Аминокислота
1-нафтилуксусная	4,21	99,93	3,14	51,3	Аминокислота Глюкуроновая кислота
2-фенилпропионовая	4,60	99,84	1,93	2,2	Глюкуроновая кислота
Дифенилуксусная	3,94	99,97	3,09	45,7	Глюкуроновая кислота

Исходя из таблицы 8.17 следует, что чем выше тропность субстрата к той или иной органелле — тем выше скорости образования соответствующих, что также в достаточной степени согласуется и с опытами *in vivo*. В то же время отсутствует определенная зависимость между физико-химическими свойствами субстратов и их предпочтительным образованием в конъюгатов организме экспериментальных животных (табл. 8.18).

Не менее сложные взаимоотношения ферментов, образующих глюкурониды и сульфаты в организме. Здесь также значительный вклад в конъюгационные механизмы вносят такие факторы как структура субстрата и вид животного. Так, например, фенолы выделяются из организма свиней в виде глюкуронидов; сульфатные конъюгаты имеются в незначительных количествах. Около 79 % введенной дозы 2-нафтола экскретируются с мочой свиней в виде 2-нафтилглюкуронида и только 5 % — в виде 2-нафтилсульфата. Если в качестве субстрата используется его изомер, т. е. 1-нафтол, то 53 % его выделяется из организма в виде глюкуронида и 26 % — в виде сульфата. 1-Нафтол конъюгирует с глюкуроновой кислотой в печени и слизистой оболочке кишечника крыс [84].

В целом реакция конъюгации чужеродных соединений с глюкуроновой кислотой — самая распространенная реакция синтеза у млекопитающих. Например, фенилглюкуронид является основным метаболитом фенола в моче у приматов, грызунов, плотоядных, зайцеобразных, рукокрылых и насекомоядных млекопитающих. У кошек, однако, фенол выделяется как сульфатный конъюгат и только менее 1 % введенной дозы в моче присутствует в виде фенилглюкуронида.

При исследовании реакций конъюгации билирубина и 2-аминофенола *in vitro* препаратами печени человека, обезьян, крыс, мышей, кролика, собаки и кошки установлено, что кошки — единственный вид, у которого отсутствует способность образовывать глюкуронид-2-аминофенол, в то время как билирубин конъюгирует с глюкуроновой кислотой. На основании этого сделано предположение, что фермент, участвующий в конъюгации билирубина, не идентичен тому, который катализирует образование 2-аминофенилглюкуронида [84].

О низкой способности ферментов кошек образовывать глюкурониды свидетельствуют опыты *in vivo* с фенолом, борнеолом, 4-метилоксикумарином, 2-амино-4-нитрофенолом, 8-оксихинолином и 2-метилоксибензойной кислотой. Оказалось, что в их моче присутствовало лишь незначительное количество конъюгатов, введенных соединений с глюкуроновой кислотой. Фенол, 1- и 2-нафтолы, морфин и 4-ацетамидофенол выделяются из организма кошек почти полностью в виде сульфатных конъюгатов (табл. 8.19). У крыс, наоборот, конъюгация фенолов с глюкуроновой кислотой служит одним из главных путей в метаболическом превращении этих соединений. Таким же образом гидрохинон, 2,6-диметоксифенол, 2-ацетамидофлуорен выделяются с мочой кошек в виде сульфатных конъюгатов (12—16 % дозы) и в незначительной степени (около 1—3 % дозы) — в виде глюкуронидов. Однако у кошек не все фенолы плохо конъюгируют с глюкуроновой кислотой. В частности, у них в большом количестве образуются глюкуроновые конъюгаты фенолфталеина. Так, при внутрибрюшинном введении

Таблица 8.19

Содержание в моче кошек и крыс конъюгатов фенолов

Соединение	Доза соединения в моче через 24 ч, %	● Метаболит, выделившийся с мочой, %		
		глюкуронид	сульфат	другие
Кошки				
Фенол (в/б)	63	1	88	12
Фенол (перорально)	49	1	97	2
1-нафтол	91	1	98	0
2-нафтол	73	3	98	0
Морфин	88	Не обнаружено	71	28
Фенацетин	56	3	86	11
Крысы				
Фенол	95	44	55	0
1-нафтол	59	47	53	0
2-нафтол	86	52	48	0
Морфин	72	57	Не обнаружено	43
Фенацетин	58	24	72	4

фенолфталейна через 24 ч в моче у кошек обнаружено 60 % глюкуроновых и 40 % сульфатных конъюгатов.

Какие же биологические последствия угрожают семейству кошачьих из-за того, что они плохо конъюгируют некоторые ксенобиотики с глюкуроновой кислотой? Известно, например, что определенные фенолы более токсичны для кошек, чем для крыс, кроликов и морских свинок. Если процессы глюкуроновой конъюгации таких фенолов очень сильно ограничены у кошачьих, то последние в значительной степени будут зависеть от другого конъюгационного механизма — сульфирования который, по-видимому, является одним из возможных механизмов адаптации этих животных к окружающей среде. Вероятно,

видовые различия, обнаруженные в процессе глюкуронизации у кошачьих, также связаны с образом жизни и особенно с пищей. Кошачьи, как истинные плотоядные, поедают очень мало растительной пищи, и в их организме образуется намного меньше фенолов, чем у травоядных.

Если молекула имеет две или более функциональные группы, то обычно конъюгирует только одна группа. Например, у кроликов *пара*-оксибензойная кислота образует конъюгаты с глицином или глюкуроновой кислотой по карбоксильной группе или с глюкуроновой кислотой или сульфатом по гидроксильной группе, хотя у собак выделяется небольшое количество диглюкуронида. Двойные конъюгаты образуются легче, если конъюгация по одной функциональной группе не увеличивает полярность молекулы настолько, чтобы вызвать быстрое выделение. Ацетамидофенолы и оксианизолы, например, снова конъюгируются с глюкуроновой кислотой или сульфатом. Если предотвратить быстрое выделение конъюгата почками, то дальнейшая конъюгация более вероятна; перфузия изолированной печени крысы нитрокатехолсульфатом сопровождается образованием двойного конъюгата — 2-глюкуронозидо-5-нитрофенилсульфата [74].

Тетрабромфенолфталеин обычно образует и с глюкуроновой кислотой, и с глутатионом двойной конъюгат, который у крыс выделяется в желчь. Морфин-3,6-диглюкуронид является примером двойной конъюгации с одним и тем же гликоном.

Если гидроксильная группа субстрата находится у асимметричного атома углерода, например, оксазепам, то такой препарат представляет собой как R-, так и S-форму. В этом случае R-оксазепам образует глюкурониды и этот процесс катализируется как UGT1A9, так и UGT2B7. В образовании глюкуронидов S-оксазепама участие принимает UGT2B15. Представленные результаты свидетельствуют о том, что субстратная специфичность UGT, а возможно и других синтетаз, зависит не только от структуры атакуемого вещества, но и от положения акцептирующей группы в одном и том же соединении.

ЭЛИМИНАЦИЯ ЛЕКАРСТВ

Рассматривая рис. 7.4 (раздел 7.2), можно заметить, что профиль кривых распределения лекарств по органам и тканям имеет тенденцию к изменению во времени. В большинстве случаев вслед за быстрой фазой поступления лекарства в орган или ткань, составляющих определенный паттерн, наступает медленная фаза, характеризующаяся снижением содержания веществ или их метаболитов в этих отсеках. Следовательно, наряду с процессами накопления лекарственного вещества происходит их удаление или очищение органа или ткани. Такое явление носит название элиминация (elimination) и является, своего рода, конечным этапом всего многообразия процессов в системе ADME. Элиминация ксенобиотиков — процесс, характерный как для отдельной клетки, так и для органа и ткани. Напомним, что он осуществляется различными механизмами, описанными нами ранее для отдельной клетки (раздел 6.3).

В том случае, когда целостный организм представляет собой отдельный паттерн, элиминация лекарственного препарата из него квалифицируется как процесс, состоящий из двух составляющих — метаболизма и экскреции. Отметим, что в организме роль резервуара, куда поступает ксенобиотик практически из всех органов и тканей, выполняет кровь. Поэтому из крови или ее плазмы вещество экскретируется ренальным и/или биллиарными путями. Однако оно может выводиться и с выдыхаемым воздухом, молоком, слюной.

Для объяснения некоторых сторон процесса элиминации обычно используют понятие скорости:

$$\begin{aligned} \text{Скорость элиминации} &= \\ &= \text{скорость поступления вещества} - \text{скорость выведения.} \end{aligned}$$

В экспериментальной фармакокинетике обычно устанавливают количество выделившегося препарата из организма животных за определенные отрезки времени (24—96 ч). Полученные опытные данные позволяют в дальнейшем решать ряд задач математического моделирования изучаемых процессов.

Нами проведена серия исследований по выявлению различий в элиминации некоторых веществ меченых радиоактивным углеродом (табл. 9.1). Так из организма крыс 76,1 % введенной дозы феназепама (14 мг/кг) выводится в течение 96 ч. При этом основное его количество выделяется в течение первых двух суток и преимущественно с мочой [406].

Количество выделившегося гидазепама (1,4 мг/кг) за аналогичный промежуток времени составило 95,3 %. Несмотря на то,

Таблица 9.1

Количество выведенного препарата (общего радиоактивного материала) из организма крыс (% введенной дозы)

Время опыта, ч	Моча	Кал	Суммарно
Феназепам			
24	31,0	16,2	46,7
48	40,0	25,6	65,7
72	43,6	28,6	72,2
96	46,5	29,7	76,1
Гидазепам			
24	12,0	20,9	33,0
48	15,2	62,3	77,7
72	17,3	72,8	91,2
96	18,7	76,9	95,3
Аза-15-краун-5, модифицированный ГАМК			
24	20,5	19,9	40,4
48	36,8	27,6	64,4
72	41,6	33,3	74,8
96	46,9	35,6	82,5

что феназепам и гидазепам относятся к одному и тому же классу (1,4-бенздиазепины) последний в основном выделяется с калом [407].

Абсолютно иное, по сравнению с предыдущими веществами, отмечено выведение аза-15-краун-5. Это соединение относится к мембраноактивным комплексонам, осуществляющим транспорт катионов через биомембраны по градиенту электрического потенциала. Такие ионофорные свойства макрогетероциклов дают возможность использовать их как инструменты в изучении биомембран, а также предполагать их применение в качестве биологически активных веществ [408, 409]. В этой связи представляют интерес краун эфиры с фармакофорными группами (глицин, ГАМК и др.). Для аза-15-краун-5, модифицированного ГАМК наблюдается только несколько большее количество, выделившегося вещества с мочой.

Учитывая тот факт, что к важнейшим механизмам, способствующим активному транспорту веществ в кишечник относится степень их выведения с желчью, можно заключить, что физико-химические свойства лекарств играют значительную роль в этих процессах. Аналогичная картина наблюдается и для почечной экскреции соединений.

9.1. ПОЧЕЧНАЯ ЭКСКРЕЦИЯ ЛЕКАРСТВ

Почки очищают плазму крови от некоторых веществ, концентрируя их в моче. Значительная часть таких веществ представляет собой конечные продукты обмена (мочевина, мочева кислота, креатинин), которые организм не может использовать. Все эти вещества должны быть удалены с мочой, поскольку они образуются в слишком больших количествах, чтобы их можно было вывести каким-либо другим путем, а при избыточном накоплении они могут вызвать отравление. К подобным веществам относятся и лекарства. В данном случае к почкам предъявляется

только одно требование: все такие вещества должны удаляться в достаточном количестве.

Структурно-функциональной единицей почки, непосредственно отвечающей за образование мочи, служит *нефрон* (рис. 9.1).

Он состоит из почечного канальца и клубочка (почечного тельца). В пределах коркового вещества несколько канальцев открываются в собирательную трубочку.

Почечный клубочек образован пучком капилляров, к которым примыкает внутренняя стенка двухслойной боуменовой капсулы, образованной канальцевым эпителием.

Почечные канальцы начинаются с извитых участков, переходящих в короткие прямые каналцы. Проксимальный отдел нефрона состоит из извитого и прямого канальцев. Дистальный

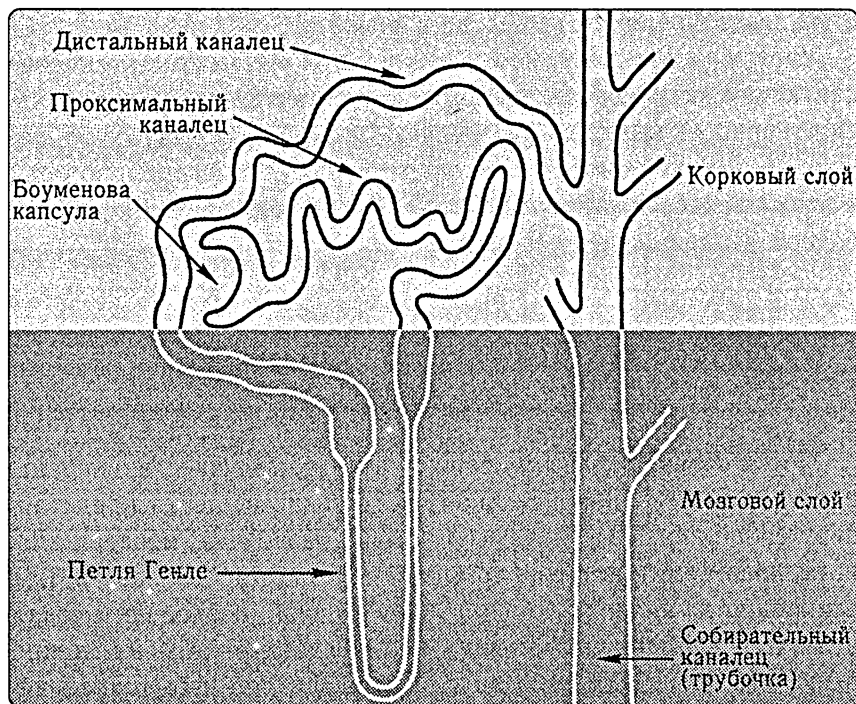


Рис. 9.1. Схема строения нефрона

отдел нефрона начинается с прямого канальца, переходящего в относительно короткий извитой каналец. Прямой каналец проксимального отдела, тонкий сегмент и прямой каналец дистального отдела образуют петлю Генле. Между проксимальными отделами располагается тонкий сегмент. Проксимальные и дистальные извитые канальцы всегда лежат в пределах коркового вещества. Большое значение имеет тот факт, что дистальные извитые канальцы нефронов контактируют с выносящими артериолами клубочков этих же нефронов.

В корковом веществе дистальный извитой каналец открывается в собирательную трубочку. Ветви этих трубочек располагаются в корковом веществе и внутренних слоях мозгового вещества. В конечном счете собирательные трубочки открываются в область сосочков чашечек почечных лоханок.

Клетки почечных канальцев осуществляют исключительно большую работу по транспорту различных веществ. Это выражается в количестве переносимых веществ и в химическом разнообразии соединений и элементов, транспортируемых из просвета канальцев в кровь.

В некоторых типах почечных клеток, где особенно выражена способность к транспорту всех биологически значимых электролитов и неэлектролитов (клетки проксимального сегмента нефрона), увеличение поверхности апикальной мембраны достигается наличием многочисленных микроворсинок, образующих клеточную каемку. В этом отношении клетки проксимального сегмента нефрона по своей структуре и функциям напоминают энтероцит (Глава 6, рис. 6.2). В обоих случаях мембрана микроворсинок имеет большую толщину, чем базолатеральные мембраны. Утолщение апикальной мембраны, по-видимому, связано с равномерным расширением всех слоев. До сих пор биологическая значимость этого феномена не представляется окончательно ясной, хотя утолщение апикальной мембраны энтероцитов может быть следствием расположения в ней большого числа гидролитических ферментов и транспортных белков [411]. Снаружи микроворсинки эпителия покрыты

слоем полисахаридов, который несколько тоньше, чем в кишечнике, так как, по-видимому, в меньшем количестве содержит адсорбированные ферменты.

Транспорт через такие мембраны неодинаков для различных веществ. Некоторые соединения, концентрация которых низка в цитоплазме, могут входить в клетку пассивно по электрохимическому градиенту (например, натрий), другие же переносятся активно (например, калий). Выделение веществ из клетки в кровь, когда оно происходит против электрохимического или химического градиента, требует затраты энергии и участия специфических переносчиков. В настоящее время не для всех веществ ясно, через какую из мембран они проходят активно, а через какую — пассивно. Наиболее развиты процессы активного переноса в базальной части почечной клетки, где сосредоточены основные энергетические ресурсы и наблюдается значительная складчатость плазматической мембраны.

Экскреция лекарственных веществ и их метаболитов происходит с участием нескольких физиологических процессов: *клубочковой фильтрации, канальцевой реабсорбции и канальцевой секреции*. Следовательно, эти процессы тесным образом связаны с образованием мочи в почках. Вначале, по мере прохождения крови через клубочки путем фильтрации, интенсивно образуется «первичная моча». В дальнейшем фильтрат проходит через почечные канальцы и собирательные трубочки. Состав его при этом существенно изменяется в результате чрезканальцевого транспорта воды и растворенных веществ. Таким образом, перенос растворенных в плазме веществ в первичную мочу осуществляется неспецифически. Этот факт имеет большое значение, так как благодаря неспецифичности такого переноса многие фильтруемые вещества, содержащиеся в плазме крови, могут переходить в мочу. Более того, образующийся ультрафильтрат, который содержит лекарства и их метаболиты, по концентрации аналогичен плазме крови.

Для клубочковой фильтрации лекарств существуют определенные ограничения. Так, скорость, с которой вещество переходит в фильтрат, зависит от его концентрации в плазме и молекулярной массы. Препараты с молекулярной массой 5000 и менее (т. е. большинство лекарственных средств) фильтруются в почечных клубочках [410].

Зная молекулярную массу различных выводимых почками веществ, можно сделать выводы о фильтрационных свойствах клубочковой мембраны и о размерах ее пор. По мере возрастания молекулярной массы растворенных веществ их прохождение через поры затрудняется. Фильтруемость молекул гемоглобина (64 кД) составляет лишь около 3 %, а альбумина плазмы (69 кД) — значительно ниже (1 %). По-видимому, молекулярная масса порядка 80 кД является абсолютным пределом для прохождения частиц через поры. Более крупные белки (глобулины плазмы) уже не могут фильтроваться через мембраны клубочков. Таким образом, в клубочках происходит ультрафильтрация, в результате которой образуется практически не содержащий коллоиды макромолекул фильтрат. Расчеты, основанные на всех этих данных, позволяют предположить, что средний радиус пор клубочкового фильтра составляет 3,5—4 нм. Эти данные хорошо согласуются с результатами электронной микроскопии о строении основной мембраны, которая представляет собой сетчатую структуру, образованную тонкими коллагеновыми нитями. Промежуток между этими нитями составляет примерно 3—7,5 нм. Возможно, именно эти промежутки выполняют функции пор фильтра.

Исходя из сказанного, становится также понятно и то, почему лекарства связанные с белками имеют незначительную скорость фильтрации.

Отметим также, что клубочковая фильтрация, как и любой аналогичный процесс, обусловлена исключительно физическими факторами. Работу для ее осуществления совершает сердце, обеспечивающее фильтрационное давление.

В канальцах может происходить либо реабсорбция веществ из фильтрата (при этом их выделение в той или иной степени уменьшается), либо секреция новых порций веществ (при этом выделение возрастает).

В ходе канальцевой реабсорбции большая часть первичного фильтрата возвращается в кровь околоканальцевых капилляров. В процессе же канальцевой секреции в фильтрат поступают вещества, содержащиеся в крови этих капилляров (например, некоторые органические кислоты), либо образующиеся в клетках канальцев (например, ионы водорода и аммиак). Канальцевая реабсорбция и их секреция могут быть либо активными, либо пассивными.

Активная реабсорбция и секреция происходит главным образом в проксимальном канальце. В более дистальных отделах нефрона осуществляется тонкая регуляция содержания сильных электролитов, воды и ионов водорода. Она необходима для регуляции гомеостаза.

Механизмы реабсорбции веществ в основном изучены на глюкозе и аминокислотах. Несмотря на то, что глюкоза беспрепятственно проникает через клубочковый фильтр, в норме она в моче не содержится. Из этого следует, что глюкоза должна полностью реабсорбироваться в канальцах. Выделение глюкозы с мочой (гликозурия) возможно лишь тогда, когда ее содержание в крови превышает пороговый уровень (10 ммоль/л). При более высоких концентрациях скорость выделения глюкозы с мочой возрастает прямо пропорционально ее содержанию в плазме.

Реабсорбируется глюкоза главным образом в начальных отделах проксимального извитого канальца. В первой половине этого канальца реабсорбируется 98 % всей отфильтрованной глюкозы. Сопряжение транспорта глюкозы и натрия осуществляется в апикальных мембранах клеток проксимального отдела [412].

9.1.1. ТРАНСПОРТНЫЕ СИСТЕМЫ МЕМБРАН КАНАЛЬЦЕВЫХ КЛЕТОК

Активный чрезканальцевый перенос не зависит от градиента и может осуществляться даже против этого градиента. Активный перенос всегда идет только в одном направлении и характеризуется высокой специфичностью в отношении того или иного вещества. Как и в ранее рассмотренных ситуациях (раздел 6.3.2) относительно почек, различают первичный чрезканальцевый транспорт ионов и вторичный (сопряженный) активный перенос (например, реабсорбция глюкозы).

Сопряжение транспорта глюкозы и натрия осуществляется на апикальных мембранах клеток проксимального отдела. Участвуют в этом процессе *переносчики глюкозы*, из которых наилучше изучены шесть изоформ *GLUT1—5* и *SGLT1* [413]. Необходимо отметить, что система переноса глюкозы используется с аналогичными целями и другими соединениями, в частности витамином С. Этот препарат всасывается в тонком кишечнике и с кровью транспортируется в различные органы и ткани, в том числе и в почки, где участвует в реабсорбции. Витамин С существует в двух физиологических формах: L-аскорбиновая кислота и дегидро-L-аскорбиновая кислота [414].

Окисленная форма аскорбиновой кислоты является конкурентным ингибитором транспорта глюкозы, поэтому имеются предположения [415] о возможном использовании переносчиков сахаров для дегидро-L-аскорбиновой кислоты. Оказалось, что *GLUT1*, *GLUT3* и *GLUT4* в физиологических условиях способны переносить аскорбиновую кислоту и этот процесс может быть ингибирован большими концентрациями глюкозы.

В связи с тем, что изученные *GLUT* имели незначительное сродство к дегидро-L-аскорбиновой кислоте была предпринята попытка идентифицировать собственный переносчик для этого вещества [416]. Такими белками стали *SVCT1* и *SVCT2*. Первый из них локализован на поверхности эпителия почечных

канальцев, второй — на базолатеральном участке. Обе изоформы стереоизбирательны в своем действии, имеют оптимум $\text{pH} \sim 7,5$ и их зависимость от ионов натрия составляет: аскорбиновая кислота / Na^+ 1:2. Для них характерны и тканевые особенности. Так, SVCT1 экспрессируется в значительных количествах в эпителиальных тканях, а SVCT2 в большей степени в мышцах и легких.

Молекулярная масса SVCT составляет 70,4 кД, количество аминокислотных остатков — 650. Локализуется SVCT1 в пятой хромосоме человека, локус 5q31.2—31.3, а SVCT2 в локусе 20p13 [417]. Подобно другим белкам-переносчикам SVCT имеют доменное строение молекулы, и их количество составляет 12. Отметим, что по своей топологии SVCT значительно отличаются от транспортного белка, переносящего ионы натрия.

Пути выведения почками аминокислот и глюкозы в общих чертах сходны. Аминокислоты беспрепятственно проходят через клубочковый фильтр и в дальнейшем почти полностью реабсорбируются. Реабсорбция аминокислот происходит в проксимальном канальце и также сопряжена с переносом натрия. Для различных аминокислот существуют различные транспортные системы, о чем свидетельствует конкурентное ингибирование реабсорбции одних аминокислот другими [418]. В настоящее время обнаружены отдельные системы переноса основных аминокислот (аргинин, лизин, орнитин), кислых (глутаминовая и аспарагиновая кислоты) и нейтральных (глицин, пролин).

Если с отдельными аминокислотами многое становится понятным, то с короткими (ди-, три-) пептидами дело обстоит иначе. Тем не менее, интерес к такого рода соединениям резко возрастает. Все больше появляется сведений о наличии среди таких структур веществ с различной биологической активностью. Например, в наших исследованиях [419, 420] получен на основе облигатной замены второй аминокислоты лейцина на фенилаланин и L-пролина на его D-изомер аналог меланостатина ($\text{HCl D-Pro-Phe-Gly-NH}_2$), обладающий высокими антиамнестическими и антидепрессивными свойствами. Такой заменой

нам удалось сохранить биологически активную конформацию молекул меланостатина (β -изгиб II-рода). Для такого меченого соединения отмечена и необычная фармакокинетика [421].

В настоящее время установлена структура двух *переносчиков коротких пептидов* в клетках млекопитающих [422]: PEPT1(SLC15A1) и PEPT2(SLC15A2). Оба имеют одинаковую топологию, являются мембраносвязанными и содержат 12 доменов. Количество аминокислотных остатков PEPT1 составляет 708, а для изоформы — 729. Кроме эпителиальной ткани почек эти белки представлены в тонком кишечнике и легких.

Субстратами PEPT служат ди- и трипептиды различного строения. Одно из обязательных требований переносчиков к пептидам: последние должны содержать в своей структуре L-аминокислоты. Даже замена одной аминокислоты на D-изомер делает такой пептид недоступным для переносчика.

Принцип действия PEPT в канальцевых клетках представляется следующим образом. Во-первых, скорость транспорта веществ зависит от трансмембранного потенциала. Поступают они через апикальную мембрану по принципу антипорта, используя при этом градиент концентраций $\text{Na}^+ - \text{H}^+$, а через базолатеральную — $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATФазу}$. Во-вторых, поступившие в цитоплазму короткие пептиды в цитоплазме претерпевают гидролитическое расщепление до отдельных аминокислот. Они в свою очередь могут быть утилизированы клеткой, либо стать субстратом для аминокислотных транспортных систем.

Если использовать в качестве субстрата пептидомиметик, то он с помощью PEPT способен через апикальную мембрану проникать в клетку. Однако отсутствие истинных амидных связей не позволяет их молекулам быть субстратами пептидаз. Поэтому пептидомиметики с помощью других переносчиков (неустановленной природы) через базолатеральную мембрану выводятся наружу [423].

Предполагается, что целый ряд антибиотиков, содержащих в своей структуре β -лактамное кольцо могут быть субстратами PEPT, что до некоторой степени делает их более эффективными

и менее токсичными по сравнению с другими антибактериальными препаратами. Очевидно, структура таких антибиотиков как пенициллины и цефалоспорины способствует их связыванию с РЕРТ. Действительно, все они имеют скелет, напоминающий трипептид с концевым углеродным атомом, образующим пептидную связь, сочлененную с β -лактамным кольцом. Когда С—N-связь в β -лактамном кольце поворачивается на 180° образуется своего рода L-трипептид, имеющий высокое сродство к РЕРТ. Однако эти антибиотики имеют значительно меньшее сродство к переносчикам локализованным в базолатеральной мембране [424].

Такие ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, как каптоприл, эналаприл, фозиноприл с высокой аффинностью ($K_m = 22 \mu\text{m}$) взаимодействует с РЕРТ2 и несколько ниже с РЕРТ1.

Целый ряд пролекарств (бестаин, валациклоvir), активируются эстеразами, а РЕРТ доставляют их в надлежащий участок.

Механизм реабсорбции белков иной, чем низкомолекулярных веществ. Если ввести альбумин внутривенно и через некоторое время приготовить гистологический препарат почки, то этот белок можно обнаружить в клетках проксимальных канальцев. На препаратах видно, что белок захватывается путем пиноцитоза. В дальнейшем он подвергается распаду при участии лизосом и исчезает из клетки.

В проксимальном отделе нефрона локализованы еще несколько транспортных систем, активно секретирующих ксенобиотики. Они действуют независимо друг от друга, а конкурентное ингибирование обнаружено только между веществами, секретируемыми одной и той же системой. Структурные и функциональные особенности этих систем детально рассмотрены в разделе 6.3.3. В этой части будет дана характеристика транспортным системам, имеющим непосредственное отношение к секреции лекарственных средств.

Большинство первичных, вторичных, третичных и четвертичных аминов при физиологических значениях рН используют

в качестве переносчиков в мембранах *транспортные системы органических катионов* (ОСТ). Несмотря на идентичность строения ОСТ во многих органах и тканях, все же их функции могут быть, с физиологической точки зрения, различны. Если ОСТ размещаются в эпителии кишечника, то они участвуют в переносе лекарства из энтероцита в кровь (всасывание), если же они находятся, например, в ГЭБ, то они захватывают клетками нервной ткани вещества, т. е. участвуют в распределении соединения. И, наконец, почечные ОСТ транспортируют соединения из плазмы крови в мочу, используя механизмы фильтрации и секреции.

В проксимальном отделе нефрона локализованы три потенциал-зависимые изоформы ОСТ (ОСТ1, ОСТ2, ОСТ3) и две H^+ -градиент-зависимые (ОСТN1 и ОСТN2). Благодаря согласованному действию обеих систем удастся с высокой производительностью экскретировать такие лекарственные средства как циметидин, амилорид, морфин, верапамил, триметоприм и др. [55]. Данный перечень свидетельствует о том, что для некоторых из перечисленных препаратов переносчиками служат также и РЕРТ.

Следует отметить, что высокая степень экспрессии ОСТ в почках экспериментальных животных дала возможность последующему их клонированию и изучению свойств [425].

К наиболее «экскреторным» переносчикам относятся *транспортные системы органических анионов*. Они составляют одно семейство, состоящее из двух подтипов (Oatp и OAT). Наиболее приспособленными к выделительным функциям являются все четыре изоформы OAT (OAT1, OAT2, OAT3 и OAT4) в значительных количествах экспрессирующиеся в почках. Все они, в свою очередь, подразделяются на три группы в зависимости от источника энергии для осуществления их функционирования: Na^+ -зависимые, Na^+ -независимые и те, что требуют АТФ.

Две последние системы имеют широкий круг субстратов и осуществляют секрецию анионов как в почки, так и в печень. В то же время, Na^+ -зависимые OAT используют небольшое количество субстратов, которые реабсорбируются в проксимальном отделе нефрона [55]. OAT1 в значительных количествах

экспрессируется в почечной ткани и имеет высокое сродство к производным *пара*-аминогиппуровой кислоты, дикарбоксилатам, циклическим нуклеотидам, простагландину Е, нестероидным противовоспалительным средствам и диуретикам. Предполагается [59], что аналогичные функции ОАТ2 выполняет в гепатоцитах. Производные *пара*-аминогиппуровой кислоты и циметидин выводятся с мочой при участии ОАТ3 [426].

Несколько отличается по своей структуре ОАТ4, так как содержит в своей молекуле только 38—44 % аминокислотных остатков, характерных для остальных ОАТ [427]. Участвует этот переносчик в экскреции эстронсульфата, желчных кислот, сульфобромфталейна, диуретиков и др.

По-видимому, для транспортеров подтипа *Oatp* не существует строго избирательного переноса веществ, характерного лишь для одного представителя. Все они с успехом переносят холевую, дезоксихолевую, гликохолиевую, таурохолевую кислоты, конъюгаты эстрогенов, оуабаин, дигоксин [428].

Экскреция производных пиримидинов и пуринов осуществляется с участием так называемых *нуклеозидтранспортных систем* [59]. Сегодня можно с уверенностью сказать, что среди многообразия этих транспортеров в почках локализованы *es/ENT1* и *ei/ENT2*, транспортирующие производные пурина, в том числе и пуриновые нуклеозиды. Аденозин и пиридиновые нуклеозиды используют в качестве транспортных средств *cit(N2)*, а гуанозин, аденозин и пиридиновые нуклеозиды *cit(N4)*.

Антрациклины (доксорубин, даунорубин), алкалоиды (винкристин, винбластин), иммуносупрессоры (циклоспорин А), сердечные гликозиды (дигоксин), антибиотики (рифампин), ингибиторы протеаз (ритонавир, индинавир) являются субстратами *переносчиков группы Р-гликопротеинов (P-gp)*. В организме человека содержатся гены, кодирующие в почках *MDR1*, а в организме мышей и крыс *mdr1a/1b*, а хомяков — *p-gp1* и *p-gp2* [429]. Рассматривая перечень субстратов *P-gp*, поражает тот факт, что эти переносчики связывают как амфифильные, нейтральные, так и положительно заряженные соединения, что противоречит

классическому пониманию лиганд-рецепторного взаимодействия. Тем не менее это не так, так как исследования [430] показали, что MDR содержат два связывающих центра. Один из них несет ответственность за взаимодействие с циклоспорином А, верапамилом, актиномицином D, а второй — с винбластином.

Вторая группа *P-gp* в почках представлена MRP2, MRP3 и MRP6, участвующими в процессах транспорта конъюгированных субстратов. Однако, как представляют некоторые авторы [59], они в большей степени отвечают за билиарную секрецию лекарств. Субстратная специфичность этих транспортеров зависит не только от их активного центра, но в этот процесс определенный вклад вносят полярные аминокислотные остатки трансмембранного сегмента 17 (TM17), а также заряд других сегментных спиралей и цитоплазматической петли [431]. Мутации MRP1 (Треонин 1246), MRP2 (Треонин 1254) и MRP3 (Треонин 1242) меняют значительно субстратную специфичность транспортеров.

Скорость экскреции и клиренс многих выделяемых почками слабых органических кислот и оснований варьирует в широких пределах [410]. В некоторых случаях содержание ряда таких веществ в моче может быть настолько высоким, что возникает предположение об их активной секреции. Однако в настоящее время известно, что перенос подобных веществ в канальцах осуществляется путем пассивной секреции, а колебания их концентраций обусловлены изменениями pH мочи.

Пассивная секреция ряда слабых органических кислот и оснований в канальцах почек получила название неионной диффузии. В недиссоциированном состоянии такие вещества хорошо растворяются в жирах и поэтому могут диффундировать через липидный слой мембран канальцевых клеток. В ионизированном виде слабые кислоты и основания плохо проникают через клетки канальцев, в связи с чем они задерживаются в фильтрате и выделяются с мочой. Поэтому для переноса вещества путем неионной диффузии необходимо, чтобы по обе стороны стенки канальца существовал градиент концентрации

недиссоциированных молекул этого вещества. Такой градиент концентрации обычно возникает в результате канальцевой реабсорбции.

Чрезканальцевый градиент концентрации недиссоциированных молекул может также возникнуть в результате изменений рН мочи. При этом изменяется степень диссоциации слабых кислот и оснований. При относительно низких значениях рН мочи слабые кислоты находятся в моче преимущественно в недиссоциированном виде, а основания — в диссоциированном. В связи с этим скорость реабсорбции слабых кислот при кислой реакции мочи возрастает, а скорость их выделения снижается. Напротив, скорость реабсорбции слабых оснований в этих условиях уменьшается, а скорость выделения повышается. При щелочной реакции мочи наблюдается обратная картина.

Таким образом, состав мочи, поступающий в конечном счете в мочеточники определяется тремя процессами — клубочковой фильтрацией, канальцевой реабсорбцией и канальцевой секрецией. Содержание вещества в конечной моче равно количеству этого вещества, отфильтрованного в клубочках и поступившего в фильтрат при канальцевой экскреции, за вычетом того его количества, которое реабсорбировалось в канальцах.

При выделении различных веществ почками возможны следующие комбинации этих процессов (рис. 9.2): только фильтрация, фильтрация с реабсорбцией, фильтрация с секрецией и сочетание всех трех процессов.



Рис. 9.2 Выделение различных веществ почками (комбинации процессов)

В связи с этим неудивительно, что концентрации различных веществ в моче и плазме сильно варьируют.

9.2. ЖЕЛЧНАЯ ЭКСКРЕЦИЯ ЛЕКАРСТВ

Из всех органов печень играет наиболее значительную роль в обмене веществ. Она оказывает чрезвычайно разнообразные влияния на обмен белков, жиров и углеводов, гормонов, витаминов и синтетических лекарственных средств. В связи с обсуждаемой проблемой нами будут рассмотрены лишь экскреторные и секреторные функции печени.

Секреция желчи осуществляется гепатоцитами. Она поступает в просвет желчных капилляров, представляющих собой систему щелей между соседними гепатоцитами или белками. Из желчных капилляров через внутридольковые или междольковые желчные протоки желчь проникает в более крупные желчные сосуды, сопровождающие разветвления портальной вены. В дальнейшем желчные сосуды постепенно сливаются и в области ворот печени образуют печеночный проток. Из этого протока желчь может поступать либо через пузырный проток в желчный пузырь, либо в общий желчный проток, который открывается в двенадцатиперстную кишку. В области устья общего желчного протока располагается сфинктер Оди.

Желчь вырабатывается постоянно и представляет собой золотистую жидкость, изотоничную плазме крови; ее рН равен 7,8—8,6. Поскольку вне пищеварения сфинктер Оди закрыт, желчь скапливается и концентрируется в желчном пузыре. Во время пищеварения сфинктер Оди открывается и желчь поступает в двенадцатиперстную кишку. К главным компонентам желчи относят соли желчных кислот, билирубин, холестерин, жирные кислоты и лецитин.

Большую роль в образовании желчи играет активный транспорт. Соли желчных кислот и натрий активно секретируются

в просвет желчных канальцев, а за ними по градиенту осмотического давления следует вода.

В системе желчных канальцев, как и в проксимальных почечных канальцах, различают два механизма транспорта кислот и оснований. Кроме того, здесь локализована транспортная система, с помощью которой в желчь поступают ионизированные молекулы. Практически все представители транспортных систем ОАТ, ОСТ, NT и *P-gp*, находящиеся в почках, также локализируются и в гепатоцитах [59]. Особого развития достигли в этом органе MRT, транспортирующие глюкуроновые и серные конъюгаты желчных кислот, стероидов и многих лекарственных средств, а также глутатионовые конъюгаты лекарств [432].

В таблице 9.2 представлены основные транспортные системы лекарств экспрессирующиеся в печени человека и крыс. Для сравнения даны аналогичные показатели, характерные для почек и тонкого кишечника [433].

Таблица 9.2

Основные транспортные системы лекарств печени, почек
и тонкого кишечника человека и крысы

Человек		Крыса	
наименование	локализация	наименование	локализация
Печень			
<i>Транспортеры органических анионов</i>			
NTCP	SM	Ntcp	SM
OATP-C	SM	Oatp-1	SM
OATP8	SM	Oatp2	SM
OATP-B	SM	Oatp4	SM
OAT2	SM	Oat2	SM
		Oat3	SM
		NaPi-1/Npt1	SM
<i>Транспортеры органических катионов</i>			
OCT1	ND	Ost1	SM
OCT3		Ost1A	ND
		Ostn1	ND

Продолжение таблицы 9.2

Человек		Крыса	
наименование	локализация	наименование	локализация
<i>Первичный активный транспорт</i>			
MRP1	SM	Mrp3 (EHBR, TR ⁻)	SM
MRP3	SM	Mdr1	CM
MDR1	CM	Mdr2	CM
MRP2	CM	Bsep/Spgp	CM
BSEP/SPGP	CM		
BCRP	CM		
Почки			
<i>Транспортеры пептидов</i>			
PEPT2	ND	PepT1	BBM
		PepT2	BBM
<i>Транспортеры органических анионов</i>			
OAT1	BLM	Oat1	BLM
OAT3	BLM	Oat3	BLM
OAT4	BLM		
		Oatp1	BBM
		Oat-K1	BBM
		Oat-K1	ND
		NaPi-1/Npt1	BBM
		Asbt	BBM
<i>Транспортеры органических катионов</i>			
		Oct1	BLM
		Oct1A	ND
OCT2	BLM	Oct2	BLM
		Oct3	ND
OCTN1	ND	Octn1	BBM
OCTN2	ND	Octn2	BBM
<i>Первичный активный транспорт</i>			
MDR1	BBM	Mdr1	BBM
MRP2	BBM	Mrp2	BBM
MRP4	BBM	Mrp4	BBM

Окончание таблицы 9.2

Человек		Крыса	
наименование	локализация	наименование	локализация
Тонкий кишечник			
<i>Транспортеры пептидов</i>			
PEPT1	BBM	PepT1	BBM
<i>Транспортеры органических анионов</i>			
OATP-B	ND	Oatp3	BBM
OATP-D	ND		
OATP-E	ND		
ASBT	BBM	Asbt	BBM
<i>Транспортеры органических катионов</i>			
		Oct1	BLM
		Oct3	ND
		Octn1	ND
<i>Первичный активный транспорт</i>			
MDR1	BBM	Mdr1	BBM
MRP2	BBM	Mrp2	BBM
MRP3	BLM	Mrp3	BLM
BCRP	BBM		

Примечание: SM — синусоидальная мембрана; CM — канальцевые мембраны; BBM — мембраны щеточной каймы; BLM — базолатеральная мембрана; ND — не определено

Небольшие молекулы могут реабсорбироваться в желчных каналах.

Желчные кислоты и целый ряд лекарственных препаратов в организме экспериментальных животных и человека вовлекаются в кишечно-печеночную (внутрипеченочную) циркуляцию (рис. 9.3).

Она включает в себя секрецию вещества или его метаболита в желчь, их реабсорбцию в кишечнике и повторное выведение. За сутки весь цикл у крыс повторяется 10, а у человека 6—10 раз.

Следовательно, одни лекарственные вещества элиминируются из организма с мочой, другие с желчью, а некоторые обоими путями. В чем же причины такого явления?

В зависимости от интенсивности желчной секреции лекарств они делятся на четыре группы: анионы (глюкурониды или сульфаты), катионы (четвертичные амины), нейтральные (неионизированные), например, сердечные гликозиды и металлоорганические соединения.

Изучение взаимосвязи между химическим строением, физико-химическими свойствами веществ с их скоростью секреции в желчь показало, что этот процесс зависит, в первую очередь от полярности и молекулярной массы молекулы.

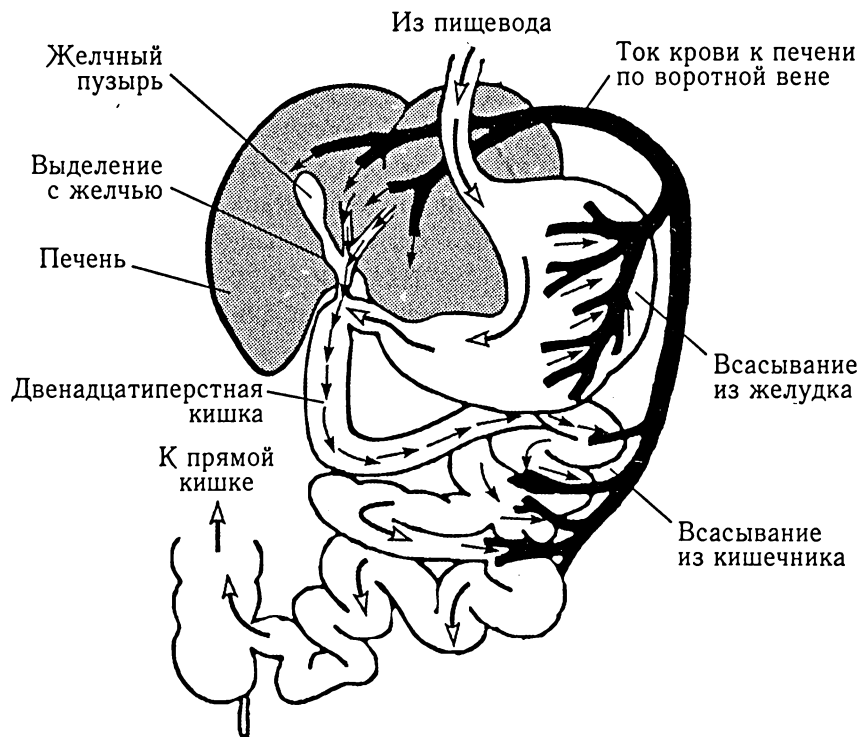


Рис. 9.3. Внутрипеченочная циркуляция лекарственных средств

Роль молекулярной массы веществ в интенсивности их желчной секреции можно проиллюстрировать на примере экзогенных и эндогенных соединений. Обычно билирубин, тироксин, стильбэстрол, морфин и хлорамфеникол, которые имеют молекулярную массу 268—777, полностью секретируются в желчь в виде соответствующих глюкуронидов с молекулярной массой 445—953. Соединения с молекулярной массой меньше 300 незначительно выводятся в желчь и составляют 1—5 % вводимой дозы [433]. Примером таких соединений могут служить монозамещенные производные бензола (толуол, анилин, фенол) с молекулярной массой 78—94, фтордизамещенные (2-амино-бензойная, салициловая кислоты, 2-аминофенол) с молекулярной массой 109—137 и *пара*-дизамещенные (4-аминофенол, 4-амино-бензойная, 4-нитробензойная кислоты, сульфаниламид) с молекулярной массой 109—214. Они выводятся из организма крыс, собак, морских свинок и кроликов в количестве 1—9 % введенной дозы (0,13—0,77 ммоль/кг). Увеличение молекулярной массы соединения за счет введения в молекулу тяжелых атомов или больших заместителей приводит к усилению интенсивности его секреции в желчь. Так, йодирование 4-аминогиппуровой кислоты увеличивает выведение ее у крыс на 25 %. Аналогичные результаты получены и для 3,5-дийодантраниловой кислоты.

Наличие гетероциклической структуры или алифатической цепи в простых ароматических соединениях также способствует повышению скорости и количества их экскреции с калом из организма экспериментальных животных. Впервые такая закономерность отмечена при введении в молекулы сульфаниламидов и сульфанилацетамида триазольного кольца и сукцинильной группы [434].

Следует отметить, что не все соединения, имеющие молекулярную массу выше 300, в значительных количествах секретируются в желчь, например, полисахариды, белки и азокрасители. Для полисахаридов и белков это можно объяснить огромной молекулярной массой, а для азокрасителей такое явление

долгое время оставалось непонятным. Лишь недавно было сделано предположение о том, что существование азокрасителей в растворе в агрегатном состоянии, по-видимому, обуславливает их странное поведение в организме [435].

В настоящее время введено понятие пороговых величин молекулярной массы соединений, ниже и выше которых их желчная секреция незначительна. В случае органических анионов их молекулярная масса должна составлять 325 ± 50 для крысы и 400 ± 50 для кролика. Для человека предполагают, что такой величиной может быть 500, т. е. интенсивность выведения органических анионов у человека и кролика близки.

Как уже указывалось, полярность молекул — также необходимый фактор, определяющий интенсивность их секреции в желчь. В данном случае термин полярность следует понимать несколько шире, чем это принято в химии. Обычно в химии полярными считаются молекулы, имеющие группы (карбонильные, сульфогруппы или в крайнем случае четвертичные аммониевые), способные к ионизации. Названные группы существуют в водной среде в виде заряженных ионов при физиологических значениях pH. Отсюда ясно, что сердечные гликозиды не имеют заряженного катионного центра, но наличие в молекуле одного или нескольких остатков сахаров делает их полярными, что, в свою очередь, приводит к их значительной секреции в желчь.

Обычно лекарства или полярны, или приобретают такие свойства в результате метаболических превращений. К первой группе относятся органические вещества с молекулярной массой около 300 и содержащие одну или две полярные группы. Так, сукцинилсульфатамид содержит одну, а 5,5-метилendisалициловая кислота — две карбоксильные группы и поэтому она практически полностью секретируется в желчь в неизменном виде. Вещества, имеющие анионные полярные группы, интенсивно выделяются в желчь только в том случае, когда их $pK_a \leq 5$. Сильные кислоты не попадают в желчь [435].

Многие соединения претерпевают в организме экспериментальных животных и человека ряд метаболических превращений,

которые способствуют образованию полярных групп в их молекуле.

Однако интерпретировать данные, свидетельствующие о взаимосвязи величин полярности лекарств с их интенсивностью секреции в желчь, надо осторожно, так как введение в процессе метаболизма полярных групп приводит к увеличению молекулярной массы соединений. Кроме того, полярные группы могут маскировать другие группы, ответственные за процессы конъюгации с эндогенными веществами. Соединения, которые становятся полярными за счет реакций синтеза в организме, могут в неодинаковой степени выводиться с желчью у различных видов животных, что объясняется неидентичностью у последних конъюгационных процессов.

Несмотря на очевидность значения таких физико-химических параметров веществ, как молекулярная масса и полярность, для их секреции с желчью, все же во многих случаях нельзя только этими факторами объяснить рассматриваемый процесс. Большое значение для такой секреции органических соединений имеет их молекулярная структура. Введение в молекулу заместителей (атомов или групп) не приводит к значительному изменению их молекулярной массы и полярности, но тем не менее влияет на их интенсивность секреции с желчью. Исследования, проведенные с N⁴-замещенными сульфатиазола, подтверждают отмеченную закономерность [434].

В одном случае лекарства, выделившиеся с желчью в тонкий кишечник экспериментальных животных, не абсорбируются в кишечнике и выводятся с калом обычно в таком же количестве, как и секретирующиеся в желчь, что отражает отсутствие их потерь в организме. К таким веществам относятся сульфатиазол, сукцинилсульфатиазол, бензометамин, трибензилметиламмоний и дибензилдиметиламмоний. Все они практически не абсорбируются в кишечнике, хотя полностью выводятся из организма с калом. Уровень в плазме крови данных веществ контролируется лишь их желчной секрецией, и внутрипеченочная циркуляция не играет роли в проявлении ими фармакологических свойств.

В другом случае выделившееся с желчью неизменное лекарственное средство или его метаболит в желудочно-кишечном тракте человека и животных при воздействии ферментов кишечника и микрофлоры претерпевает метаболические превращения.

Лекарства с измененной в кишечнике структурой могут также полностью выделяться с калом или абсорбироваться. Те соединения, которые абсорбируются в кишечнике, поступают в воротную вену и затем — в печень. Некоторые вещества подвергаются внутрипеченочной циркуляции, но их извлечение из печени настолько полное, что они в незначительной степени или совсем не достигают системы кровотока. Поэтому, если они и попадают в рециклический процесс, то не проявляют видимой биоактивности.

Перераспределение абсорбировавшихся из кишечника веществ, которые полностью извлекаются из печени, осуществляется кровеносной системой. Они могут абсорбироваться из кишечника в систему кровообращения через лимфу, однако для большинства лекарств этот путь не имеет большого значения.

Иногда после повторной секреции веществ в желчь и реабсорбции в кишечнике они могут выводиться из организма через почки. Так, индометацин в виде глюкуронида практически полностью секретируется в желчь у собак, обезьян и морских свинок. После реабсорбции из кишечника он выводится с мочой у обезьян и морских свинок и с калом — у собак [436].

Следует отметить, что желчная экскреция многих лекарств проходит быстро. Но для некоторых видов животных наблюдается обратная картина, так как появление вещества или его метаболитов в кишечнике задерживается в результате накопления их в желчном пузыре. Соединение может находиться в желчном пузыре в течение нескольких часов и выводится прерывисто в кишечник. Очевидно, появление вторичного пика концентрации некоторых лекарств в плазме крови связано с такой закономерностью.

Кроме физико-химических свойств лекарств на их внутрипеченочную циркуляцию влияют различные биологические факторы, среди которых определяющими являются вид и пол животных, а также сродство вещества к белкам плазмы крови. Рассматривая видовые и половые различия во внутрипеченочной циркуляции веществ, необходимо учитывать все стороны данного процесса: экскрецию соединений в желчь, их метаболизм и реабсорбцию.

Секреция веществ в желчь широко варьирует у различных видов животных и зависит от молекулярной массы соединений [435]. Для простых моно- и дизамещенных производных бензола (мол. масса 70—200) видовые различия их экскреции в желчь практически отсутствуют [437]. Для соединений, содержащих два или более ароматических или гетероциклических кольца (мол. масса 300—500), отмечены наиболее существенные видовые различия. Многочисленные ароматические и гетероциклические вещества (мол. масса 500—1000) секретируются в желчь различных видов животных не в одинаковой степени, но эти различия не столь значительны, как у предыдущей группы соединений. Так, около 40 % введенной дозы противоопухолевого препарата дихлорметотрексата секретируется в желчь у кролика, 60—62 % — у мышей и человека и 80 % — у крыс и собак [438].

Изучены половые различия желчной секреции органических веществ на 4-ацетамидгиппуровой кислоте, сукцинилсульфатазоле, фенолфталеине, индоциане зеленом. Самцы крыс экскретируют все вещества, кроме последнего, в большем количестве, чем самки, в то время как самки кроликов больше экскретируют исследуемые соединения за исключением первого, чем самцы [437].

Видовые и половые особенности метаболизма лекарств животными могут повлиять на степень их секреции в желчь, что вызвано их способностью связываться с белками крови. Установлена прямая зависимость между константами связывания альбумина плазмы бромсульфалеина, билирубина и ряда

стероидов и их интенсивной секрецией в желчь у животных. Предполагается существование нескольких причин, обуславливающих названную закономерность [435]. Во-первых, значительное сродство альбумина к лекарству способствует увеличению их транспорта в печень и последующему выведению в желчь. Во-вторых, накопление органических веществ в печени аналогично процессу их взаимодействия с белками плазмы. Однако сукцинилсульфатазол и глюкуронид фенолфталейна в этом отношении являются исключениями, так как имеют незначительное сродство к альбумину, но тем не менее интенсивно секретируются в желчь у крыс.

Изменение внутripеченочной циркуляции лекарств может быть вызвано и предварительным введением веществ, ускоряющих или замедляющих холеостаз, метаболизм соединений и формирование их комплексов с желчью. Введение крысам фенобарбитала приводит к увеличению выделения желчи у животных, а отсюда и к росту интенсивности экскреции билирубина, сульфобромфталейна, хлордана, фенилбутазона, хлорциказина. Повышение тока желчи достигается и предварительным введением животным других барбитуратов (тиопентала, пентобарбитала и барбитала).

На скорость выведения многих лекарств влияет индукция микросомальных ферментов печени. Так, содержание глюкуронида тироксина в печени повышается в три—четыре раза, если крысам предварительно вводить 3,4-бензпирен. Увеличение экскреции характерно для эндогенной и экзогенной форм глюкуронидтироксина и обусловлено индукцией УДФ-глюкуронозилтрансферазы. Количество выделившейся желчи в обоих случаях оставалось на прежнем уровне. Бифенил, диэтилстильбэстрол и фенолфталейн, образующие в организме животных глюкурониды, в отличие от сукцинилсульфатазола интенсивнее выводятся в желчь крыс, обработанных фенобарбиталом.

Следовательно, индукторы ферментных систем микросом печени заметно влияют на желчную секрецию лекарств только в результате индукции УДФ-глюкуронозилтрансферазы.

Аналогичные выводы сделаны при исследовании выведения в желчь N-2-флюоренилацетамида и N-окси-2-флюоренилацетамида. Предварительное введение экспериментальным животным различных веществ иногда усиливает комплексобразование ксенобиотиков в тканях и органах, что способствует интенсификации их желчной экскреции.

Однако, доза препарата практически не влияет на количество выделившегося вещества в желчь, что показано на примере гидрохлорида тилорона [439], в отечественной практике — амиксина [440].

Методические приемы изучения желчной экскреции лекарств, а также их внутрипеченочной циркуляции детально описаны нами [441, 442] в соответствующих публикациях.

9.3. ДРУГИЕ ПУТИ ВЫВЕДЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Легкие служат основным путем элиминации многих летучих анестезирующих средств в неизмененном состоянии. В других случаях фармакотерапии роль легких в элиминации препаратов невелика. Большое медико-социальное значение имеет тот факт, что этанол выводится через легкие, отсюда возможность определения его концентрации в организме на основании содержания в выдыхаемом воздухе.

Лекарственные вещества, содержащиеся в плазме кормящих женщин, выделяются с *молоком*. Их количества в нем слишком малы, чтобы существенным образом влиять на их выведение. Однако иногда препараты, попадающие в организм грудного ребенка, могут оказывать на него существенное воздействие.

Эпителий молочной железы, подобно другим мембранам, действует как липидный барьер, содержащий поры. Через них происходит диффузия полярных низкомолекулярных лекарственных веществ. В то же время, водорастворимые соединения

с молекулярной массой больше 200 не фильтруются в молоко матери [443].

Неионизированные молекулы проникают через липидный барьер и их концентрация по обе стороны мембраны выравнивается. На степень ионизации лекарств может определенное влияние иметь и значение рН. В молоке оно составляет 7,0 (в плазме крови 7,4).

Сильные кислоты (неионизированные) обнаруживаются в незначительных количествах в ультрафильтрате молока по сравнению с плазмой крови. Для сильных оснований наблюдается обратная картина.

В организме коров отмечена реабсорбция сульфонамидов из молока в плазму крови.

Следует также отметить высокий уровень липидов в молоке по сравнению с плазмой, поэтому лекарственные вещества в них накапливаются. Количество лекарства, связанного с белками молока, обычно наполовину меньше, чем связанного с белками плазмы.

Некоторые данные о поступлении лекарственных веществ в молоко и рекомендации общего характера по этой проблеме представлены в монографии [54].

Сульфамидные препараты выделяются в *слюну* околоушной железы человека (рН 5,5—7,8). В соответствие с этим, их концентрация в слюне значительно ниже, чем в плазме крови. Однако сульфамиды и некоторые барбитураты выделяются со слюной околоушной железы жвачных животных (рН 8,2—8,4) в более высоких концентрациях. Имеются также косвенные данные о выделении слюнными железами пенициллина [54].

Уровень препарата в слюне является прямым показателем уровня его свободной формы, если она имеет константу ионизации значительно отличающуюся от рН плазмы крови (т. е. слабая кислота или слабое основание). Однако для кислых препаратов с pK_a ниже 8,2 или щелочных с pK_a выше 6 концентрация препарата в слюне не всегда отражает истинное содержание свободной фракции лекарства в плазме крови. При измерении

концентраций препаратов в слюне ширина диапазона терапевтических концентраций практически всегда больше ширины содержания в плазме крови.

Дифетал (диэтилдитиолизоталат), лекарственное средство против проказы, является необычным в том отношении, что оно выделяется в *пот* человека в количествах, равных или превышающих суммарное выделение с мочой и калом [74]. Сульфамиды в следовых количествах также экскретируются с потом.

9.3. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ЭЛИМИНАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

При систематическом изучении выделения различных веществ во многих случаях (например, рис. 7.4 и табл. 9.1) можно убедиться в том, что скорость экскреции гидазепама (т. е. его количество, выделяемое в единицу времени) изменяется пропорционально его концентрации в плазме крови. В то же время скорости экскреции разных веществ почками существенно различаются, причем различия эти сохраняются даже в том случае, если рассчитывать скорость выведения для одинаковых значений концентрации веществ в плазме и скорости диуреза. Такие различия обусловлены тем, что экскреция многих веществ осуществляется почками не одинаковыми способами. Так, если лекарство фильтруется в клубочках и секретируется в канальцах, то скорость его экскреции, очевидно, будет выше, чем у препарата, подвергающегося после фильтрации канальцевой реабсорбции (рис. 9.2). Более того, даже если различные лекарственные вещества выводятся одинаковым способом, скорость их экскреции может быть различна, если механизмы их транспорта в канальцах неодинаковы (например, в случае простой и облегченной диффузии). Для того, чтобы объяснить различия в скорости выведения почками тех или иных веществ, необходимо количественно оценить интенсивность их фильтрации в клубочках

и переноса в канальцах. Такая оценка стала возможна после введения понятия *клиренса* и разработки фильтрационно-реабсорбционно-секреторной гипотезы.

Принципы лекарственного клиренса сходны с концепцией клиренса в физиологии почек, в соответствии с которой клиренс креатинина определяется как скорость его элиминации с мочой в сравнении с концентрацией в плазме.

Важно отметить аддитивный характер клиренса. Элиминация вещества из организма может происходить, как указывалось выше, с участием процессов, идущих в почках, печени, легких и других органов. Путем деления скорости элиминации в каждом из органов на концентрацию лекарств в плазме крови мы получаем относительный клиренс каждого органа. В совокупности эти отдельные показатели образуют общий системный клиренс (Cl).

Величина общего клиренса, является одной из фундаментальных экспериментальных характеристик в фармакокинетике и определяется произведением кажущегося объема распределения вещества на константу элиминации:

$$Cl = V_{kel}$$

В соответствие с этим определением размерность общего клиренса зависит от размерностей V и kel . В зависимости от того или иного способа выражения каждой из них размерность Cl может быть: мл/мин, л/час, мл/(мин·кг), мл (мин·м²) и т. д.

Иногда такой процесс обозначают как элиминацию первого порядка. В этом случае клиренс можно измерить путем расчета площади под кривой на графике время—концентрация после введения определенной дозы. Отсюда клиренс пропорционален дозе, разделенной на величину площади под кривой:

$$Cl = \frac{D}{AUC}.$$

Таким образом, клиренс какого-либо вещества количественно равен объему плазмы, полностью очищающемуся от него (почками, печенью и т. д.) за 1 мин.

В некоторых случаях исследователю необходимо уточнение механизмов экскреции лекарства с мочой. С этой целью, используя закономерность, представленную на рис. 9.2 и определяя соответствующий клиренс веществ можно судить о способе их выведения. Если сравнить клиренс препарата (Cl_b) с клиренсом инулина (Cl_i), можно сделать следующие выводы:

1. $Cl_b < Cl_i$: экскреция вещества происходит путем фильтрации и реабсорбции;
2. $Cl_b = Cl_i$: экскреция вещества происходит путем фильтрации;
3. $Cl_b > Cl_i$: экскреция вещества происходит путем фильтрации и секреции.

Правомочность подобных заключений зависит от того, насколько исходные допущения применимы по отношению к исследуемому веществу. В связи с этим бывает необходимо проводить дополнительные исследования (молекулярная масса, связывание с белками плазмы и др.).

Другим вспомогательным параметром, характеризующим процесс элиминации лекарств и связанным определенным образом с клиренсом является *период полувыведения препарата* ($t_{1/2}$). В простейшем случае организм рассматривается как единое целое, имеющее размер, равный V_d . Поскольку элиминирующие препараты органы очищают от них ту плазму или кровь, которая проходит через данный орган эти жидкости находятся в равновесном состоянии с общим объемом распределения. Таким образом $t_{1/2}$, зависит от объема распределения и клиренса:

$$t_{1/2} = \frac{0,693 - V_d}{Cl}.$$

Период полувыведения сам по себе недостаточен для использования в качестве показателя элиминации лекарств или их распределения. Заболевания могут повлиять на физиологические параметры организма, а отсюда на объем распределения,

клиренс и, таким образом, показатель $t_{1/2}$ не обязательно будет отражать истинную картину ожидаемых изменений элиминации лекарства.

При повторном введении лекарства оно может накапливаться в организме до тех пор, пока не прекратится выведение. Это связано с тем, что теоретически требуется неограниченное время для полной элиминации данной дозы. Практически это означает, что если интервал между дозами короче, чем четыре полувыведения, то может возникнуть кумуляция. Общепринятый показатель кумуляции обозначают как фактор кумуляции (R). Он определяет отношение *стационарной концентрации* (C_{ss}) к концентрации, достигаемой после введения первой дозы (C_1):

$$R = \frac{C_{ss}}{C_1}.$$

Стационарная концентрация лекарства в плазме крови — та концентрация, которая содержится в ней при поступлении препарата в организм с постоянной скоростью. В случае введения или приема препарата через одинаковые промежутки времени в одинаковых дозах используют понятие максимальной стационарной концентрации: $C_{ss(max)}$. В большинстве случаев R рассчитывается, используя показатели $C_{ss(max)}$ и $C_{i(max)}$.

ФАРМАКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ADME

Все процессы, рассматриваемые нами в Главах 6—9, могут быть сведены в общую схему (рис. 10.1).

В целом, она отражает многообразие процессов и показателей, характеризующих систему ADME. Все они, в той или иной мере, являются основой, определяющей такие направления в базисной фармакологии как фармакогенетика (ADME/PG), лекарственная токсикология (ADME/*t*) и фармакокинетика (ADME/PK). Принцип биоактивации лекарств-предшественников является основополагающим в создании пролекарств.

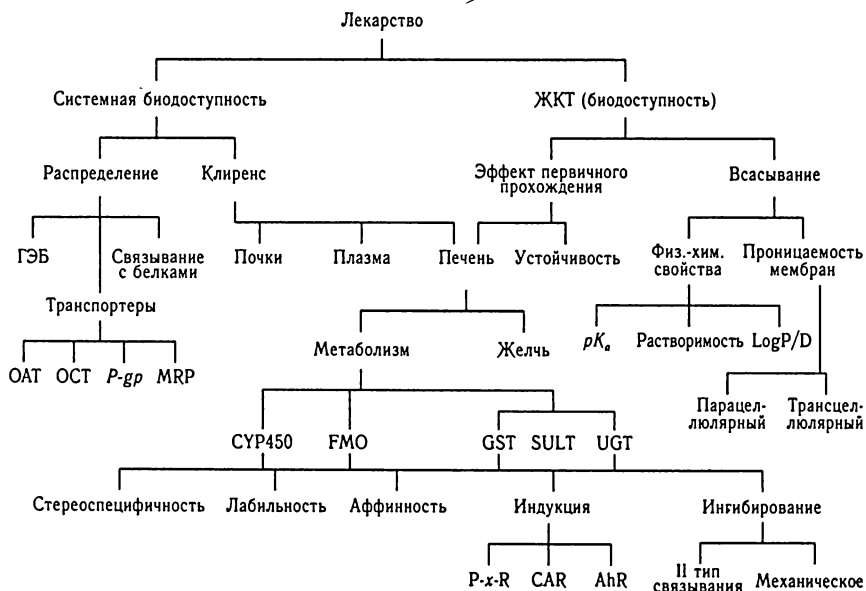


Рис. 10.1. Основные стадии системы ADME

10.1. ФАРМАКОГЕНЕТИКА

Изучение разных аспектов действия лекарственных средств на организм человека, как следует из рисунка 10.1, представляет собой задачу многих направлений науки. Поиски общих закономерностей этого воздействия связаны с необходимостью исследования широкой вариабельности соответствующих ответных реакций, обусловленной в большей или меньшей степени генетической конституцией индивидов, их уникальностью генотипа.

Подобно тому, как проблематика генетики включает в себя весь комплекс задач по изучению наследственности и изменчивости, предметом фармакогенетики является исследование генетических механизмов, определяющих сложность взаимодействия организм—лекарство. Возникнув на стыке фармакологии и биохимии чужеродных соединений с одной стороны и молекулярной биологии и генетики — с другой, фармакогенетика превратилась в самостоятельную дисциплину, имеющую свои теоретические основы и методические подходы.

Основной объект молекулярной биологии и генетики — гены и их продукты. Биологи пытаются представить себе, как они функционируют в организме. Такие исследования дали начало новому направлению в науке — геномике, объект которой — совокупность всей наследственной информации организма, т. е. его гена. В последнее время этот раздел науки стал объектом внимания и фармакологов. Процессы взаимодействия низкомолекулярных лекарств с геном квалифицируются как фармакогеномика (Глава 12). Поэтому в последнее время фармакогенетику считают составной частью *фармакогеномики* [444].

Работа генов определяет какие белки синтезируются в клетке, а от их разнообразия и активности зависят многие процессы, происходящие в организме. Отсюда еще одно направление в биологии, имеющее непосредственное отношение к фармакогенетике — *протеомика*, изучающая полный набор белков организма.

В целом, контакт организма с лекарственным средством опосредуется различными биологическими системами и ответ на его воздействие будет различен и будет зависеть как от свойств препарата, так и от индивидуальных особенностей организма. При этом наиболее существенное влияние на вариабельность эффекта оказывают процессы метаболизма лекарственных веществ, зависящие от особенностей генотипа пациента. История этого вопроса довольно продолжительна. Она связана с интенсивным изучением наследственных дефектов ферментных систем, выявляемых при применении лекарств [445, 446]. Это исходит с предпосылки о том, что задача фармакогенетики — всестороннее исследование причин возникновения атипичных реакций на лекарственные препараты, в частности, в выявлении нарушений ферментных механизмов метаболизма, их обусловленности генетическими факторами и анализе распределения в популяциях.

Несмотря на то, что семейный характер биохимических аномалий, обуславливающих атипичные реакции на лекарство, проследить весьма сложно, все же к этому времени удалось описать некоторые наследственные дефекты метаболизма, которые ведут к медикаментозным идиосинক্রазиям. Это относится к атипичной псевдохолинэстеразе, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназе и особенно N-ацетилтрансферазе. В связи с тем, что отмеченные ферментативные процессы являются важным этапом метаболизма ограниченного класса соединений, основной упор исследований в области фармакогенетики сместился в сторону CYP450. Поэтому вопрос генетического контроля процессов метаболизма ксенобиотиков нами также рассмотрен на примере CYP450. Популяционные исследования и генеография метаболического статуса других ферментов рассмотрена нами при анализе соответствующих ферментных систем (Глава 8).

Как указывалось ранее (раздел 8.1.1.1.2) CYP450 составляют собой суперсемейство гемопротеинов, имеющих множество изоформ — изоферментов. Такие генетически обусловленные вариации в структуре ферментов имеют не только видовые, но и индивидуальные различия. Последняя особенность обуслов-

лена существованием множественных генных локусов, кодирующих варианты ферментного белка, или же существованием множественных аллелей одного локуса. Появление указанных вариантов связано с происхождением изоферментов. Изоферменты — это множество форм данного фермента, появление которых связано с генетически детерминированными различиями в первичной структуре. К ним не относят формы, образующиеся вследствие модификации одной и той же последовательности аминокислотных остатков.

По данным различных групп исследователей в области изучения генома человека показано, что у него находятся более 50 генов, кодирующих CYP450, которые объединяются в 17 семейств (табл. 10.1). Семейства 11, 24 и 27 кодируют

Таблица 10.1

Общая характеристика семейств генов CYP450 человека [447]

CYP	Выполняемая функция фермента	Количество	
		подсемейств	изоформы
1	Метаболизм ксенобиотиков	2	3
2	Метаболизм ксенобиотиков	9	14
3	Метаболизм ксенобиотиков и стероидов	1	4
4	ω -гидроксирование жирных кислот и лейкотриена	5	9
5	Тромбоксансинтетаза	1	1
7	Холестерин и стероид 7 α -гидроксирование	2	2
8	Синтез жирных кислот (12 α ОН) и простациклина	2	2
11	Синтез стероидных гормонов	2	3
17	Синтез стероидных гормонов	1	1
19	Ароматаза(синтез эстрогена)	1	1
21	Синтез стероидных гормонов	1	1
24	1 α , 25-дигидроксивитамин D ₃ инактивация	1	1
26	Инактивация ретиноевой кислоты	1	1
27	Активация витамина D ₃ и синтез желчных кислот	2	2
39	24-оксихолестерин 7 α -гидроксилаза	1	1
46	Холестерин 24-гидроксилаза	1	1
51	Ланостерин 14 α -деметилаза	1	1

митохондриальные ферменты, а остальные — микросомальные. Кроме того, идентифицировано 14 псевдогенов, которые не кодируют функциональных белков. Определение изоферментов CYP450 путем идентификации соответствующих генов осуществляется с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и называется генотипированием.

Таким образом, CYP450 человека катализирует реакции гидроксилирования ксенобиотиков и эндогенных веществ (табл. 10.1).

В процессе биосинтеза белка иногда происходят ошибки, влекущие за собой изменение нормальной последовательности аминокислотных остатков; образуется аномальный белок, который может быть лишен биологической активности. Такой аномальный белок представляет собой результат генетической мутации. Мутация происходит, если в ДНК, кодирующей данную полипептидную цепь, химически изменяется или выпадает одно мононуклеотидное звено или же если в эту молекулу ДНК включается один лишний мононуклеотид.

При этом нормальная, непрерывная последовательность кодирующих триплетов в гене изменяется и соответствующим образом изменяется аминокислотная последовательность полипептидной цепи, которую этот ген кодирует. В большинстве случаев дело ограничивается заменой одной единственной аминокислоты на другую.

Однонуклеотидные замены (SNP, single nucleotide polymorphism) — наиболее распространенный вид полиморфизма, встречается, в среднем, через каждые 300—400 п. н., отличается высокой стабильностью и может служить эффективным фармакогенетическим маркером [448]. К настоящему времени картировано уже 60 000 SNP, что соответствует 1 SNP на 1,08 т. п. н.

Экспрессия мутантных генов приводит к изменению скорости метаболизма лекарств. Большинство людей имеют нормальные гены ферментов метаболизма, однако в некоторых случаях распространены мутантные гены. По мутации гена соответствующего фермента выделяются следующие группы индивидуумов:

1. Экстенсивные (активные метаболитаторы, имеющие нормальный ген того или иного фермента). К ним относятся большинство людей;

2. Медленные метаболитаторы, имеющие мутации гена того или иного фермента. Это приводит к синтезу дефектного фермента, либо к его отсутствию. У медленных метаболитаторов лекарственный препарат накапливается в организме в высоких концентрациях, что приводит к появлению побочных эффектов;

3. Сверхактивные или быстрые метаболитаторы имеют мутации гена, приводящие к синтезу фермента с высокой метаболической активностью. Следствием этого является недостаточная для достижения терапевтического эффекта концентрация препарата в крови.

Медленных и быстрых метаболитаторов выявляют по активности ферментов (фенотипирование) или путем идентификации мутантных аллелей (генотипирование). Распространенность различных метаболитаторов в этнических группах представлена в таблице 10.2.

10.1.1. ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ CYP450, КАТАЛИЗИРУЮЩИХ ОКИСЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВ

Гены изоферментов CYP450, катализирующие лекарственные вещества и другие ксенобиотики находятся в разных хромосомах и разных локусах (табл. 10.3).

Ген *CYP1A1* имеет ряд мутаций (табл. 10.4).

Наиболее важной мутацией *CYP1A1* являются аллели *CYP1A1*2B* и *CYP1A1*2C*, синтезированные в результате замен в нуклеотидной последовательности и как результат в аминокислотной последовательности (Ile462Val). Индуцируется фермент ПАУ. Субстратами, наряду с ксенобиотиками, являются теофиллин, имипрамин, клозапин, фенацетин. В качестве

Таблица 10.2

**Распространенность «медленных» и «быстрых» метаболитов
в различных популяциях [80]**

Фермент метаболизма	Фенотип	Популяция (этническая группа)	Частота, %
CYP2D6	«Медленные» метаболиты	Белое население США	6 %
		Афроамериканцы	2 %
		Коренное население Северной Америки	1—4 %
		Арабы	1 %
		Китайцы	0,7—1 %
		Европейцы	5—10 %
		Словаки	4 %
		Японцы	0 %
		Ганейцы	0—7,1 %
		Нигерийцы	0—8,1 %
		Египтяне	1,4 %
		Гренландцы	3,2 %
		Жители Гонконга	20 %
	«Быстрые» метаболиты	Европейцы	20 %
		Испанцы	7 %
		Скандинавы	1,5 %
CYP2C9	«Медленные» метаболиты	Белое население США	0,06 %
		Афроамериканцы	0,05 %
		Китайцы	0,026 %
		Европейцы	1—3 %
CYP2C19	«Медленные» метаболиты	Белое население США	4 %
		Коренное население Северной Америки	23 %
		Европейцы	2—5 %
		Азиатское население	15—20 %
DPD	«Медленные» метаболиты	Японцы	0,01 %

Окончание таблицы 10.2

Фермент метаболизма	Фенотип	Популяция (этническая группа)	Частота, %
NAT	«Медленные» метаболизаторы	Белое население США	60 %
		Коренное население Северной Америки	20 %
		Европейцы	50—58,6 %
		Монголоиды	10—15 %
		Эскимосы	10—5 %
		Японцы	12 %
		Китайцы	22 %
		Индусы	59 %
		Московская популяция	46 %
		Египтяне	90 %
TPMT	«Медленные» Метаболизаторы	Афроамериканцы	4,6 %
		Европейцы	3,7 %

Таблица 10.3

Локализация генов изоферментов цитохрома P450,
участвующих в метаболизме лекарственных препаратов

Изофермент	Хромосома	Локус
1A1	15	15q22—q24
1A2	15	15q22—qter
2A6	19	19q13.2
2B6	19	19q13.2
2C9	10	10q24.1—24.3
2C19	10	10q24.1—24.3
2D6	22	22q13.1
2E1	10	10q24.3—qter
3A4	7	7q22.1

Таблица 10.4

Аллели гена CYP1A1 [80]

Аллель	Белок	Изменения в ДНК	Второе название	Изменение аминокислот- ной последова- тельности	Активность цитохрома	
					<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
CYP1A1*1A	CYP1A1.1	Нет	Дикий тип	—	Норма	Норма
CYP1A1*1B	CYP1A1.1	3219C→T	—	—	Норма	Норма
CYP1A1*1C	CYP1A1.1	3229G→A	—	—	Норма	Норма
CYP1A1*2A	CYP1A1.1	3801 T→C	m1	—	Норма	Норма
CYP1A1*2B	CYP1A1.2	2455A→G; 3801T→C		Ile462Val	—	Высокая индуци- бельность
CYP1A1*2C	CYP1A1.2	2455A→G	m2	Ile462Val	—	Высокая индуци- бельность
CYP1A1*3	CYP1A1.1	3205T→C	m3	—	Норма	Норма
CYP1A1*4	CYP1A1.4	2453C→A	m4	—	—	—

маркерного субстрата для фенотипирования CYP1A1 используется кофеин.

Другой представитель этого класса — CYP1A2 состоит из 515 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 58 кД. Его ген также имеет ряд мутаций (табл. 10.5).

Однако распространенных мутаций гена CYP1A1, ведущих к значительным изменениям метаболизма лекарственных препаратов, пока не обнаружено. Тем не менее в некоторых случаях отмечалось [450] тримодальное распределение активности CYP1A2 при использовании в качестве субстрата кофеина.

CYP2A6 представляет собой белок, состоящий из 494 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 56 кД. Фермент имеет ряд мутаций (табл. 10.6).

Таблица 10.5

Аллели гена CYP1A2

Аллель	Белок	Изменения в ДНК	Второе название	Изменение аминокис- лотной последова- тельности	Активность цитохрома	
					<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
CYP1A2*1A	CYP1A2.1	Нет	Дикий тип	—	Норма	Норма
CYP1A2*1B	CYP1A2.1	5381T→C	—	—	Норма	Норма
CYP1A2*1C	CYP1A2.1	3858G→A	—	—	Снижение	
CYP1A2*1D	CYP1A2.1	2464 делеция, T	—	—	Норма	Норма
CYP1A2*1E	CYP1A2.1	740T→G	—	—	Норма	Норма
CYP1A2*1F	CYP1A2.1	164C→A	—	—	Повышение индуцибель- ности	
CYP1A2*2	CYP1A2.1	63C→G	—	Trp21Lys	?	?

Особый интерес представляют аллели CYP2A6*4A, CYP2A6*4B, CYP2A6*4C и CYP2A6*4D, относящиеся к так называемым нулевым аллелям. Образуются они в результате точечных мутаций — делеции (выпадение одного основания). Делеции могут возникать в результате гидролитического отщепления пуринового основания (при повышении температуры или понижении pH), в результате обработки веществами, вызывающими ковалентные «сшивки» между комплементарными цепями ДНК, а также под воздействием алкилирующих агентов. При этом образуются основания, неспособные к комплементарному спариванию. Такие гены относятся к дефектным и они, как правило, не кодируют полной полипептидной цепочки фермента. Поэтому такие белки, во многих случаях, невозможно зарегистрировать.

Таблица 10.6

Аллели гена CYP2A6 [80]

Аллель	Белок	Изменения в ДНК	Второе название	Изменение аминокис- лотной последова- тельности	Активность цитохрома	
					<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
CYP2A6*1A	CYP2A6.1	Нет	—	—	Норма	Норма
CYP2A6*1B	CYP2A6.1	—	—	Конверсия в 3'-конец региона	—	—
CYP2A6*2	CYP2A6.2	479T→A	v1	Leu160His	Нет активности	Нет активности
CYP2A6*3	CYP2A6.3	CYP2A6/CYP2A7 гибрид	v2	—	?	?
CYP2A6*4A	—	CYP2A6 делеция гена	CYP2A6 del	Отсутствие белка	Нет активности	—
CYP2A6*4B	—	CYP2A6 делеция гена	D-тип	Отсутствие белка	Нет активности	—
CYP2A6*4C	—	CYP2A6 делеция гена	E-тип	Отсутствие белка	Нет активности	—
CYP2A6*4D	—	CYP2A6 делеция гена	—	Отсутствие белка	Нет активности	—
CYP2A6*5	CYP2A6.5	1436G→T	—	Gly479Val	Нет активности	Нет активности

У носителей нулевых аллелей гораздо реже возникает рак легких, кроме того, они почти в 2 раза реже становятся злостными курильщиками [80]. Причем это относится не только к гомозиготам, но и к гетерозиготам по нулевым аллелям.

Снижение риска возникновения рака легких, скорее всего, связано с угнетением процесса биоактивации нитрозаминов табачного дыма у носителей нулевых аллелей.

В случае CYP2A6*2 образуется неактивный белок. Имеются сведения [450] о распространении этой мутации: среди финнов гомозиготы — 15 %, гетерозиготы — 0 %; среди афроамериканцев гомозиготы — 0 %, гетерозиготы — 2,5 %; среди японского населения гомозиготы — 20 %, гетерозиготы — 28 %; среди населения Тайваня гомозиготы — 11 %, гетерозиготы — 6 %. Показано также [451], что CYP2A6*2 не катализирует реакцию гидроксилирования кумарина, что приводит к серьезным геморрагическим последствиям у пациентов, применяющих кумарин в стандартных дозах.

Цитохром 2C9 представляет собой белок, состоящий из 490 аминокислотных остатков, имеющий молекулярную массу 55 кД.

При применении лекарственных средств — субстратов CYP2C9 у части пациентов снижен клиренс (медленные метаболиты) и, соответственно, у них чаще наблюдались побочные эффекты. При применении толбутамида и глипизида чаще наблюдалась гипогликемия, а при использовании S-варфарина геморрагические осложнения.

Методы генотипирования показали, что медленные метаболиты являются носителями мутантных аллелей CYP2C9*2 и CYP2C9*3. Они представляют собой замену в аминокислотной последовательности соответственно в 144 положении аргинина на цистеин и в 359 — изолейцина на лейцин. При этом активность CYP2C9*2 на 5 % ниже, а CYP2C9*3 на 12 % ниже CYP2C9.

Следует отметить, что цистеинсодержащий фермент имеет значительно меньшее сродство к S-варфарину и его окисления субстрата ниже, чем у аргининсодержащего. Однако эти показатели практически не отличались в случае использования фенитоина и флубипрофена в качестве субстратов. CYP2C9*3 аллель, содержащая изолейцин (359) в пять раз активнее, чем лейцинсодержащий, в случае фенитоина и толбутамида [452].

Сравнивая особенности каталитического действия аллелей CYP2C9 заметно, что для CYP2C9*2 полиморфизм является субстрат-зависимым. В то же время для аллели CYP2C9*3 наблюдается различное стереохимическое действие.

Распространенность медленных метаболизаторов по CYP2C9 следующая: США — 0,06 %, афроамериканцы — 0,005 %, Китай — 0,029 %, европейское население — 1—3 %.

Цитохром 2C19 представляет собой белок, состоящий из 490 аминокислотных остатков, имеющий молекулярную массу 55 кД. Идентифицированные на сегодняшний день аллели CYP2C19, представлены в таблице 10.7.

Кроме CYP2C19*1A и CYP2C19*1B, все остальные аллели не обладают ферментативной активностью, а их носители относятся к медленным метаболизаторам. Их распространенность среди европейского населения составляет 3 %, а среди азиатского — 20 % [453]. В целом же на долю медленных метаболизаторов европейского и японского происхождения основная часть (80 %) приходится на аллели CYP2C19*2, а остальная — на CYP2C19*3.

Наиболее изучены фармакогенетические механизмы окисления лекарств на примере *CYP2D6*. Полиморфизм этого гена впервые был обнаружен в 1977 г. в Англии [454]. При использовании дебрizonина у больных гипертонической болезнью было отмечено, что обычные дозировки препарата иногда вызывают развитие нежелательных побочных эффектов или были вообще неэффективными. В последующем выявили существование быстрых и медленных метаболизаторов. Медленные метаболизаторы встречаются с частотой от 5 до 10 % среди населения Европы, а среди арабского населения с частотой 1—2 %. Ген CYP2D локализуется в хромосоме 22 (q13.1) и включает в себя два псевдогена (CYP2D7 и CYP2D8) и полиморфный CYP2D6. Активность CYP2D варьирует от полного отсутствия до сверхбыстрого метаболизма, что зависит от комбинации по крайней мере 30 различных аллелей. Около 6 % популяции белых людей несет две нулевые аллели в локусе CYP2D6.

Таблица 10.7

Аллели гена CYP2C19

Аллель	Белок	Изменения в ДНК	Второе название	Изменение аминокис- лотной последова- тельности	Активность цитохрома	
					<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
CYP2C19*1A	CYP2C19.1A	Нет	wt1	—	Норма	Норма
CYP2C19*1B	CYP2C19.1B	99C→T; 991A→G	wt2	Ile331Val	норма	—
CYP2C19*2A	—	99C→T; 681G→A; 990C→T; 991A→G	ml; mlA	Нарушение сплайсинга	Нет актив- ности	—
CYP2C19*2B	—	99C→T; 276G→C; 681G→A; 990C→T; 991A→G	mlB	Нарушение сплайсинга	Нет актив- ности	—
CYP2C19*3	—	636G→A; 991A→G; 1251A→C	m2	Формиро- вание стоп- кодона	Нет актив- ности	—
CYP2C19*4	—	1A→G; 99C→T; 991A→G	m3	Дефект инициаль- ного кодона	Нет актив- ности	—
CYP2C19*5A	CYP2C19.5A	1297C→T	m4	Arg433Trp	Нет актив- ности	Нет актив- ности
CYP2C19*5B	CYP2C19.5B	99C→T; 991A→G; 1297C→T	—	Ile331Val; Arg433Trp	Нет актив- ности	Нет актив- ности
CYP2C19*6	CYP2C19.6	99C→T; 395G→A; 991A→G	m5	Ile331Val	Нет актив- ности	Нет актив- ности
CYP2C19*7	—	?	—	Нарушение сплайсинга	Нет актив- ности	—
CYP2C19*8	CYP2C19.8	358T→C	—	Trp120Arg	Нет актив- ности	Сниже- ние актив- ности

В Великобритании $\approx 3,6$ млн. людей не экспрессирует этот фермент (медленные метаболизаторы и, как следствие у них нарушен метаболизм широкого круга лекарственных препаратов, являющихся субстратами CYP2D6 (таблица 10.8). Дефектные аллели могут возникнуть в результате делеции гена, появления точечных мутаций, сдвига рамок считывания. С нуль-генотипом CYP2D6 связаны различные фенотипические последствия, такие как редкие летальные аномальные реакции на лекарства, например, при назначении в случаях стенокардии перфексилена; отсутствие терапевтического эффекта в результате сверхбыстрого метаболизма или вследствие отсутствия активации предшественника (пролекарства).

Среди дефектных аллелей наиболее распространенными у европейцев являются CYP2D6*4 (0,1—0,2 %), CYP2D6*3 (0,07—0,14 %), CYP2D6*5 (0,01—0,08 %), CYP2D6*6 (0,013—0,018 %). Кроме полностью дефектных аллелей, есть такие, которые вызывают незначительное снижение или изменение лекарственного метаболизма. Например, аллель CYP2D6*10 часто встречается среди китайского населения. Он кодирует синтез фермента со сниженной функциональной активностью. Аналогично аллель CYP2D6*17 распространен среди представителей африканской расы [455].

В дополнение к обозначенным нулевым аллелям CYP2D6 существуют несколько аллелей с заменой одной аминокислоты. Некоторые из них также ассоциируются с измененным фенотипом. Однако, для многих аллелей не установлено четко фенотипа, что затрудняет определить чувствительную группу людей и полезность выявления этих аллелей в прогнозировании ответа на соответствующую терапию.

Наблюдения за некоторыми индивидуумами — «сверхбыстрыми» метаболизаторами, которые являются нечувствительными или дают слабый ответ на терапию лекарственными препаратами-субстратами CYP2D6, показали выраженный полиморфизм данного гена. Причиной этого оказалась амплификация гена CYP2D6. У некоторых индивидуумов наследуется от 2, 3 до 13

Таблица 10.8

Аллели гена CYP2D6

Аллель	Изменение в ДНК	Второе название	Изменение аминокислотной последовательности
CYP2D6*1 CYP2D62*N (N = 2, 3, 4, 5, 13)	Нет 1749G→C 2938C→T 4268G→C	Дикий тип	Arg296Cys Ser486Thr
CYP2D6*3	Делеция 2637A	CYP2D6A	Сдвиг рамки
CYP2D6*4	1934G→A 188C→T 4268G→C	CYP2D6B	Сплайсинг
CYP2D6*5 CYP2D6*6 CYP2D6*7 CYP2D6*8	Делеция CYP2D6 2064G→C 3023A→C 1749G→C 1846G→T 2938C→T 4268G→C	CYP2D6D CYP2D6T CYP2D6E CYP2D6G	Делеция Сдвиг рамки His324Pro Остановка кодона
CYP2D6*11	971G→C 1749G→C 2938C→T 4268G→C	CYP2D6F	Сплайсинг
CYP2D6*12	212G→A 1749G→C 2938C→T 4268G→C	—	Gly42Arg Arg296Cys Ser486Thr
CYP2D6*13	CYP2D7P/CYP2D6 (гибрид) экзон 1 CYP2D7 экзоны 2—9 CYP2D7	—	Сдвиг рамки

Аллель	Изменение в ДНК	Второе название	Изменение аминокислотной последовательности
CYP2D6*14	188C→T 1846G→A 4286G→C	—	Pro34Ser Gly169Arg Arg296Cys Ser486Thr
CYP2D6*15	236T-вставка	—	Сдвиг рамки
CYP2D6*16	CYP2D7P/CYP2D6 (гибрид) экзоны 1—7 CYP2D7P экзоны 8—9 CYP2D6	CYP2D2	Сдвиг рамки
CYP2D6*18	9-вр вставка в экзон 9	—	Вставка
CYP2D6*19	2627A-26307-делеция	—	Сдвиг рамки
CYP2D6*2	1749G→C 2938C→T 4268G→C	CYP2D6L	Arg296Cys Ser486Thr
CYP2D6*9	—	CYP2D6C	Lys281 делеция
CYP2D6*10	188C→T 1749G→C 4268G→C	CYP2D6J	Pro34Ser Ser486Thr
CYP2D6*17	1111C→T 1726G→C 2938C→T 4268G→C	CYP2D6Z	Thr107Ile Arg296Ser Ser486Thr

тандемно расположенных копий CYP2D6. Для таких людей требуется значительное увеличение доз препаратов, метаболизируемых CYP2D6, чтобы достичь заметного терапевтического эффекта [456].

Мультикопии CYP2D6 наиболее часто встречаются среди жителей Эфиопии и Саудовской Аравии. Около 30 % населения этих стран сверхбыстрые метаболизаторы. Наличие мультикопий функционально активного гена CYP2D6 приводит к тому, что у их носителей метаболизм определенных лекарств происходит более интенсивно. Вследствие этого уровень препарата в циркулирующей крови не достигает терапевтических концентраций при обычных дозировках. Впервые такое явление было описано у больного, которому трехкратно увеличили дозу нортриптилина для достижения терапевтического уровня препарата в плазме. Оказалось, что он является носителем трех активных генов CYP2D6.

Из-за замедления активации пролекарств цитохромом CYP2D6 у медленных метаболизаторов наблюдается их неэффективное использование, в частности, снижается анальгезирующее действие трамадола. Известно также, что при приеме кодеина, который также является субстратом для CYP2D6, преобразующего его в морфин, у быстрых метаболизаторов наблюдается развитие характерного побочного эффекта морфина — абдоминальные боли. У медленных метаболизаторов не обнаруживается морфин в плазме крови и не наблюдается анальгезирующий эффект кодеина. Предполагается, что замедление метаболизма, контролируемого CYP2D6, может быть одним из защитных факторов в развитии опиоидной зависимости.

«Медленные» метаболизаторы по цитохрому 2D6 для предотвращения побочных эффектов и интоксикации требуют назначения препаратов-субстратов цитохрома 2D6 в меньших дозах. В качестве примера может служить метаболизм трициклического антидепрессанта имипрамина у «медленных» метаболизаторов по цитохрому 2D6. Имипрамин сначала подвергается N-деметилованию за счет изофермента цитохрома P450 2C19 до активных метаболитов дезипрамина и нортриптилина. Дезипрамин и нортриптилин, в свою очередь, метаболизируются путем 4-гидроксирования до неактивных метаболитов с помощью изофермента цитохрома P450 2D6. Было показано, что у «медленных» метаболизаторов по изоферменту 2D6

почти всегда отмечаются такие выраженные побочные эффекты как: гипотензия, седативный эффект, тремор, кардиотоксичность, что связано с наличием высоких концентраций имипрамина, дезипрамина и нортриптилина у этих пациентов [80].

У «медленных» метаболизаторов по цитохрому 2D6 менее выражен анальгетический эффект кодеина. Этот феномен объясняется снижением О-деметилирования кодеина, при котором образуется морфин. Кроме того, имеются данные о том, что у «медленных» метаболизаторов по цитохрому 2D6 чаще развиваются некоторые злокачественные новообразования: рак мочевого пузыря, желудка, глотки, легких (в особенности у курильщиков), первичный рак печени [456]. Предполагают, что причиной более частого возникновения рака легкого у курящих «медленных» метаболизаторов по цитохрому 2D6, является их неспособность метаболизировать никотин (котинин). Кроме «медленных» метаболизаторов по цитохрому 2D6, существуют и «быстрые» метаболизаторы, распространенность которых в Европе составляет около 3,5 %. Среди европейского населения около 7 % «быстрых» метаболизаторов являются носителями мутантных аллелей CYP2D6*2A, CYP2D6*35X2. Эти мутации наследуются по аутосомному рецессивному типу. У «быстрых» метаболизаторов по цитохрому 2D6 при применении препаратов-субстратов цитохрома 2D6 отмечается снижение их терапевтической эффективности, поэтому быстрым метаболизаторам требуется назначение препарата в больших дозах [457].

Цитохром 2E1 представляет собой белок, состоящий из 493 аминокислотных остатков, имеющий молекулярную массу 56 кД. Обнаружен ген CYP2E1 в десятой хромосоме, локусе 10q24.3 qter.

Ген CYP2E1 имеет ряд мутаций (табл. 10.9). Однако распространенных мутаций гена, ведущих к изменению активности ферментов нет. Совместно с CYP1A2 этот цитохром катализирует важную реакцию превращения ацетаминофена в N-ацетилбензохинонимин, обладающий мощным гепатотоксичным

Таблица 10.9

Аллели гена CYP2E1

Аллель	Белок	Изменения в ДНК	Второе название	Изменение аминокис- лотной по- следова- тельности	Активность цитохрома	
					<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
CYP2E1*1A	CYP2E1.1	Нет	—	—	Норма	Норма
CYP2E1*1B	CYP2E1.1	9893C→G	TaqI-	—	—	—
CYP2E1*1C	CYP2E1.1	6 повторений в 5'-конце региона	—	—	—	—
CYP2E1*1D	CYP2E1.1	8 повторений в 5'-конце региона	DraI+ +XbaI	—	Повышение индуцибель- ности под действием этанола	—
CYP2E1*2	CYP2E1.2	1132G→A	—	Arg76His	—	Нет актив- ности
CYP2E1*3	CYP2E1.3	10023G→A	—	Val389Ile	—	Норма
CYP2E1*4	CYP2E1.4	4768G→A	—	Val139Ile	—	Норма
CYP2E1*5A	CYP2E1.1	1293G→C; 1053C→T 7632T→A	PstI+ +RsaI- DraI	—	—	—
CYP2E1*5B	CYP2E1.1	1293G→C 1053C→T	PstI+ +RsaI-	—	—	—
CYP2E1*6	CYP2E1.1	7632T→A	DraI-	—	—	—
CYP2E1*7A	CYP2E1.1	261T→A	—	—	—	—
CYP2E1*7B	CYP2E1.1	71G→T 261T→A	—	—	—	—
CYP2E1*7C	CYP2E1.1	261? A 280G→A	—	—	—	—

действием. Мыши, не имеющие гена *Cyp2e1*, внешне кажутся нормальными, но очень устойчивы к токсическому действию ацетамидофена [458]. Этот факт свидетельствует о биоактивационных свойствах этого цитохрома.

Цитохром 3A4 состоит из 502 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 57 кД. Среди всех CYP450 он наиболее широко представлен в клетках млекопитающих (раздел 8.1.1.1.2). Уровень активности ферментов имеет видовые особенности, однако он не имеет генетического полиморфизма. Удивительным фактом [459] является то, что CYP3A5, использующий практически те же субстраты, что и CYP3A4, имеет мутации, экспрессирующиеся в кишечнике и фетальной печени.

Отметим также, что для CYP3A4, собственно как и для других представителей этого класса, описан важный регуляторный путь контроля экспрессии этих генов в печени и пищеварительном тракте.

Существует много факторов, не относящихся к генетически детерминированной индивидуальной чувствительности к фармакотерапии. Так, например, изменчивость терапевтического эффекта на антибиотики, противопаразитарную и противовирусную терапию связано с генетическими изменениями в организме-мишени. Возникающие в организме соматические мутации могут быть причиной лекарственной устойчивости при химиотерапии злокачественных новообразований. Тем не менее исследования в этом направлении показали, что фармакогенетический полиморфизм может быть важным фактором, определяющим исход противомикробной и противоопухолевой терапии.

Фармакологическая эффективность терапии зависит от получения требуемой концентрации препарата в заданном участке-мишени в течение достаточного для получения необходимого эффекта времени без возникновения побочных действий. Механизмы взаимодействия лекарства с мишенью на поверхности и внутри клетки также являются критическими детерминантами эффективности лекарства.

У человека есть гены, отвечающие за защиту организма от внешних химических факторов. Они же определяют чувствительность или резистентность к фармакотерапии. Большинство этих генов полиморфны. Выдвигаются различные гипотезы, объясняющие столь выраженный полиморфизм. Ряд ученых считает, что эти гены не имеют значения для выживания вида, являясь, по-видимому, рудиментом, который исчезает в процессе эволюции вида. Другие ученые придерживаются мнения о том, что полиморфизм — отражение гетерогенности факторов внешней среды и следствия давления на отдельные гены в процессе эволюции, чтобы организмы могли справиться с определенными провоцирующими факторами среды. То есть, они считают наоборот — полиморфизм является средством выживания вида. Однако эта рабочая гипотеза не может объяснить превалирование нулевых (полностью негативных) аллелей у некоторых полиморфных генов. Требуется рациональное объяснение селективного преимущества, вызванного присутствием нуль-аллелей.

Разнообразные химические вещества, поступающие в организм с пищей, воздухом и водой, стимулировали развитие ферментных систем детоксикации в процессе эволюции. Биологическая необходимость их развития заключалась в совершенствовании резистентности и адаптации к колебаниям факторов внешней среды, что способствовало увеличению продолжительности жизни, защите от тератогенных, канцерогенных влияний и индуцированных ксенобиотиками болезней.

Оптимальность жизнедеятельности каждого организма, как известно, определяется сочетанием его генотипа и окружающей среды. Они и обуславливают определенные уровни активности ферментных систем детоксикации. Значительное ухудшение экологической ситуации ведет к нарушению сбалансированной системы «генотип—среда» и способствует развитию болезней даже у гетерозиготных носителей мутантных аллелей, особенно при мультифакторных наследственных болезнях.

Такие же закономерности влияют и на результативность фармакотерапии частного варианта взаимодействия организма и лекарственных средств.

10.1.2. ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ СУР450, КАТАЛИЗИРУЮЩИХ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ ЭНДОГЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Ранее (Глава 8) нами была дана характеристика основных путей метаболизма ксенобиотиков, построенная по химическому принципу (окисление, восстановление, гидролиз и синтез). Образующиеся при этом метаболиты, в большей степени, приобретают полярные свойства и удаляются из организма.

В этом разделе мы рассмотрим метаболические пути, т. е. цепи или последовательности катализируемых СУР450 химических реакций, в результате которых осуществляется превращение определенных органических соединений, жизненно важных для организма. Вовлекаемые в такие реакции соединения также называются метаболитами. В классической биохимии метаболические пути разделяются на два типа — катаболические и анаболические.

Катаболические пути — это процессы деградации, в ходе которых крупные органические молекулы, поступающие часто в организм в качестве пищи, разрушаются (обычно в окислительных реакциях) до простых клеточных компонентов с одновременным выделением свободной химической энергии. Анаболические пути — это процессы синтеза. В ходе этих процессов из относительно простых предшественников строятся сложные органические компоненты клетки; синтез часто включает восстановительные этапы и сопровождается затратой свободной химической энергии.

Что касается СУР450, то его участие в анаболических процессах предполагает лишь незначительные изменения в структуре метаболитов, согласно каталитическим возможностям этого

гемопротеина. Необходимо отметить, что в некоторых ситуациях отдельные изоформы CYP450 могут участвовать одновременно в реакциях метаболизма ксенобиотиков и анаболизме эндогенных субстратов. В большинстве же случаев они выполняют свои функции раздельно.

Две причины побудили нас включить этот раздел в монографию. Во-первых, среди эндогенных субстратов CYP450 могут быть лекарственные средства. Во-вторых, многие синтетические лекарственные препараты могут взаимодействовать с эндогенными субстратами в организме, используя определенные изоформы CYP450.

Цитохромы 1A1 и 1B1 относятся к гемопротеинам, выполняющим одновременно метаболическую и анаболическую функции. Они экспрессируются в различных органах и тканях и являются активными окислителями ПАУ (CYP1A1), ариламинов и азотистых гетероциклов (CYP1B1). В настоящее время еще не известен эндогенный лиганд арилуглеводородного рецептора. Тем не менее установлено [460], что CYP1A1 и CYP1B1, участвующий в реакциях окисления простагландинов, эстрогенов, порфиринов (уропорфириногена) и мелатонина.

У мышей, лишенных Cyp1a1, Cyp1a2 и Cyp1b1, описаны отклонения в метаболизме канцерогенов, однако такие животные жизнеспособны. Это предполагает, что кодируемые ферменты или избыточны, или не играют существенной роли в анаболизме эндогенных соединений. В то же время мутации гена CYP1B1 (Val432Leu, Arg369Trp, Asp374Asn, Lys384Glu, Gly61Glu) вызывают у человека первичную врожденную глаукому (буфтальм). На основании этого полагают, что развитие передней камеры глаза во время эмбриогенеза требует синтеза важных эндогенных соединений и для его прохождения необходим CYP1B1. Тот факт, что этот гемопротеин играет роль в биосинтезе ретиноевой кислоты, может быть объясняет причины возникновения глаукомы.

Самым большим среди всех семейств у млекопитающих CYP450 является CYP2. Цитохромы человека CYP2C8, CYP2C9,

CYP2C18 и CYP2C19 вместе окисляют, в различных количествах, более половины всех, часто прописываемых лекарственных средств, а также арахидоновую кислоту и некоторые стероиды [461]. В последнее время показано [462], что CYP2A6, CYP2A13, CYP2B6, CYP2E1, CYP2F1 и CYP2J2 могут участвовать в метаболизме некоторых препаратов. Предполагают, что на долю CYP2D6 приходится более 75 лекарств, окисляемых этим цитохромом. Функции других изоформ, включая CYP2A7, CYP2R1, CYP2S1, CYP2U1 и CYP2W1 в настоящее время неизвестны.

Хотя подсемейства CYP2G и CYP2T обнаружены у грызунов, похоже, что у человека они представлены только псевдогенами. Это предполагает, что какую бы функцию эти гены не несли около 80 млн. лет назад, они больше не нужны человеку.

Семейство CYP3 включает 4 изофермента (табл. 10.1), а его представители CYP3A4 и CYP3A5 являются наиболее экспрессируемыми в печени и желудочно-кишечном тракте. Они метаболизируют более чем 120 лекарственных препаратов и такие эндогенные субстраты как стероиды и желчные кислоты [463]. Особое клиническое значение имеет тот факт, что метаболизм некоторых противогрибковых и иммуносупрессорных препаратов CYP3A4 и CYP3A5 может привести к недостаточному количеству этих препаратов у пациентов с высоким метаболизмом и избыточной их концентрацией у пациентов с низким метаболическим фенотипом. Функция печеночного CYP3A43 пока неизвестна. CYP3A7 экспрессируется в печени плода и маточном эндометрии, но их роль в этих тканях неизвестна.

Семейство генов CYP4 включает 12 изоформ. Одни из них — CYP4A11, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3 — участвуют в реакциях окисления жирных кислот, арахидоновой кислоты, лейкотриенов, простагландинов, другие — CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12 и CYP4F22 — гидроксилируют только жирные кислоты и арахидоновую кислоту. Некоторые ферменты CYP4A и CYP4B, экспрессированы в дистальных извитых канальцах почек и дефект

их генов вызывает нарушение солевого обмена, водного баланса и артериального давления [464].

В случае каскадных реакций, как это имеет место в анаболизме простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов, на их определенных этапах принимают участие различные изоформы CYP450 (рис. 10.2).

Различные виды действия простагландинов обобщить сложно, так как трудно описать внушительный ряд реакций организма на эти вещества, изучить видовую специфичность, способы введения, дозировки. Наряду с этим надо учитывать тканевой фактор, т. е. природу ткани, на которой изучается действие PG. PGE_1 и PGE_2 стимулируют активность аденилатциклазы, особенно в эндокринных железах. Однако эти же

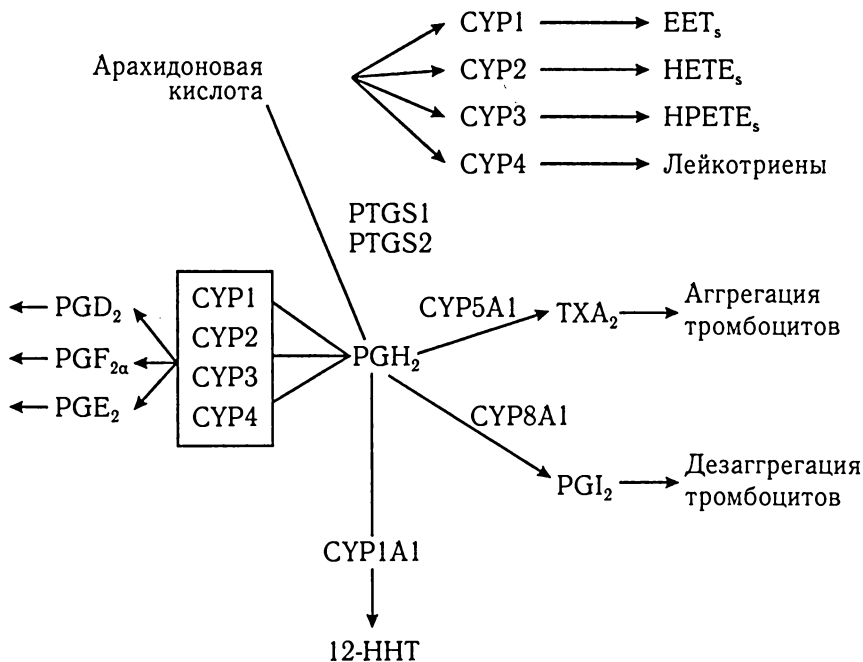


Рис. 10.2. Ферменты CYP450, участвующие в каскаде арахидоновой кислоты

простагландины ингибируют активность аденилатциклазы в жировой ткани. Другими словами, простагландины одной и той же серии могут оказывать противоположное по характеру действие. Гены тромбоксан A_2 -синтазы (CYP5A1) и простациклин-синтазы (CYP8A1) кодируют соответствующие ферменты, роль которых в свертывании крови прямо противоположная. Предполагается [465], что мутации генов CYP5A1 и CYP8A1 ведут к повышенной свертываемости крови и к воспалительным процессам.

В превращении ацетата до стерина и жирных кислот участвуют от 7 до 9 ферментов, содержащих CYP450 (рис. 10.3). Ланостерин 14 α -деметилаза, кодирующаяся геном CYP51A1, катализирует удаление двух метильных групп из молекулы ланостерина. Это окислительный процесс, так как углеродные атомы появляются в виде CO_2 ; это показывает, что метильные

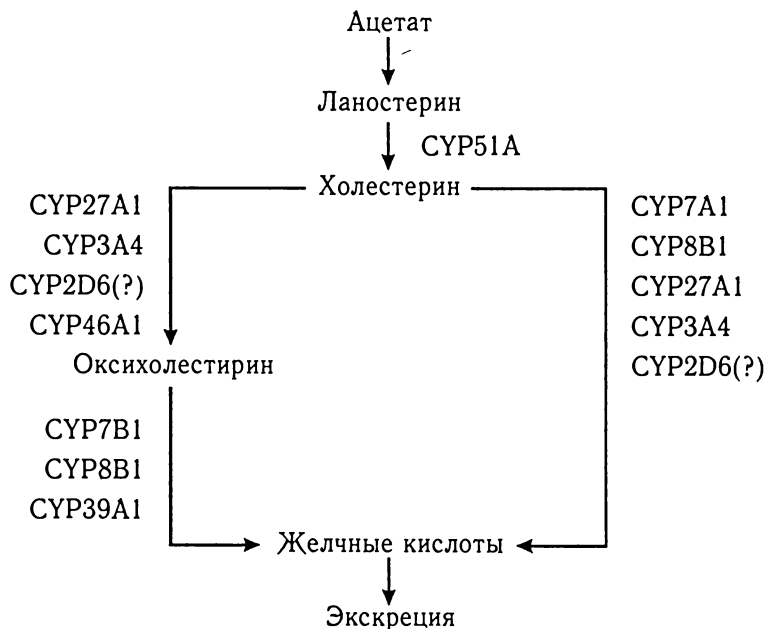


Рис. 10.3. Ферменты CYP450, катализирующие некоторые этапы синтеза холестерина и желчных кислот

группы в ланостерине, связанные с C-14 и C-4, сначала окисляются до карбоксильных групп, а затем удаляются в результате процесса декарбоксилирования.

Следует отметить, что CYP51A является биологической мишенью действия противогрибковых лекарств (кетоконазола).

Приблизительно 80 % холестерина превращается печеночной тканью в различные желчные кислоты. Количественно холевая и хенодезоксихолевая кислоты являются главными продуктами, образующимися из холестерина. При их биосинтезе гидроксирование стероидного ядра холестерина (CYP3, CYP7, CYP8, CYP27, CYP39 и CYP46) завершается до окончания деградации боковой цепи.

Иницируют синтез желчных кислот из холестерина и оксистерина CYP7A1, CYP7B1 и CYP39A1 путем гидроксирования в α -положении седьмого углеродного атома В-кольца [460].

Фарнезоид x -рецептор (рецептор желчных кислот) — член семейства ядерных рецепторов гормонов, участвует в регуляции гена CYP7A1 (раздел 10.2).

Среди других изоформ CYP450, принимающих участие в биосинтезе стерина и желчных кислот необходимо отметить CYP8B1 (стерин 12 α -гидроксилаза), CYP27A1(27/26-гидроксилаза), участвующие в окислении боковой цепи стерина.

Необычной изоформой CYP450 является CYP46A1, поскольку экспрессируется практически только в нейронах ЦНС [466]. В этих клетках фермент превращает холестерин в 24S-оксистерин, который легко проникает через гематоэнцефалический барьер и таким образом выходит в кровоток, и в печени превращается в желчные кислоты.

Описаны мутации трех из пяти генов CYP450, вовлеченных в синтез желчных кислот. Нарушение функции CYP7A1 приводит к гиперхолестеринемии и ассоциируется с устойчивостью к холестерин-снижающим средствам [467]. Мутации в гене CYP7B1 вызывают тяжелую гиперхолестеринемия у мальчиков [468]. Известно более 50 мутаций у больных с цереброксантоматозом,

который клинически протекает с прогрессирующим атеросклерозом и тяжелым неврологическим синдромом. Дефицит CYP27A1 лечится хеновой кислотой, которая восстанавливает пул желчных кислот и предотвращает синтез промежуточных продуктов обмена стероидов, обладающих токсическими свойствами.

По крайней мере шесть CYP450 участвуют в обмене стероидов (рис. 10.4). На ранних этапах эмбриогенеза во время дифференцировки генитального гребня фактор транскрипции (стероидфактор-1), член семейства ядерных рецепторов гормонов (раздел 10.2) является главным в активации генов CYP11, CYP17, CYP19 и CYP21, принимающих участие в синтезе стероидных гормонов. Все изоферменты CYP11 относятся к митохондриальным, в то время как CYP17 и CYP19 — микросомальные.

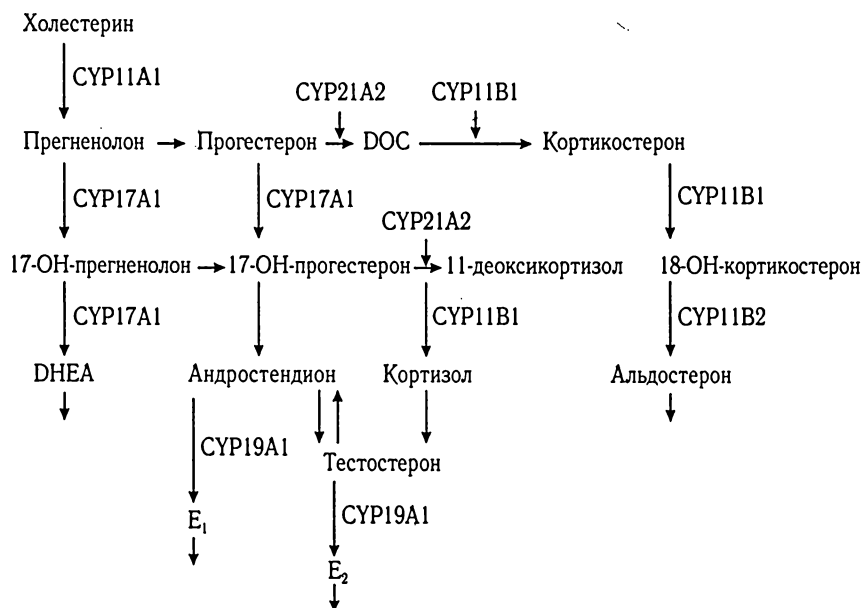


Рис. 10.4. Пути метаболизма стероидов. CYP11A1 расщепляет белковую цепь; CYP11B1-11 α -гидроксилаза; CYP11B2-альдостеронсинтаза; CYP17A1-17 α -гидроксилаза; CYP19A1-ароматаза; DHEA, E₃, E₂ — продукты гидроксилирования соответственно тестостерона, кортизола и альдостерона ферментами CYP1, CYP2 и CYP3

В этом каскаде двойную функцию выполняет CYP17A1, катализирующий 17 α -окисление стероидных субстратов и расщепление их боковых цепей. Мутации этого фермента ведут к недостатку продукции глюкокортикоидов и половых стероидов [469]. Мутации CYP11A1 являются причиной липоидной гиперплазии надпочечников. Аллелеспецифичная мутация CYP11B2 обуславливает как 1-й тип недостаточности кортикостеронметил-оксидазы, так и 2-й тип, а рекомбинация между тесно сплетенными генами CYP11B1 и CYP11B2 хромосомы 8, которые кодируют функциональные химерные ферменты, обуславливает глюкокортикоидчувствительный альдостеронизм [470].

Путем ароматизации кольца А андрогенного субстрата с помощью CYP19A1 синтезируются эстрогены. Мутации гена этого фермента, приводящего к потере его функции, вызывают избыток андрогенов, что ведет к несоответствующей вирилизации у женщин и гипервирилизации у мужчин [460].

Необходимым шагом в биосинтезе глюкокортикоидов и минералокортикоидов является гидроксилирование стероидного предшественника у 21 углеродного атома и этот процесс катализируется CYP21A1. Его мутации являются причиной более 90 % случаев врожденной гиперплазии коры надпочечников, являющейся частой генетической болезнью. Аналогичное заболевание может быть вызвано мутацией CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP17A1 или CYP19A1 [471].

Четыре фермента CYP450, три из которых находятся в митохондриях и один в эндоплазматической сети, участвуют в метаболизме витамина D₃ (рис. 10.5).

Холекальциферол (витамин D₃) транспортируется в печень, где превращается в 25-оксихолекальциферол под действием митохондриального фермента CYP27A1. Превращение сильно тормозится продуктом реакции; в результате, с одной стороны, уменьшается расход витамина, а с другой — концентрация продукта не достигает токсического уровня. В свою очередь, 25-оксихолекальциферол гидроксилируется затем в почках с образованием 24,25-диоксихолекальциферола. Поскольку эту

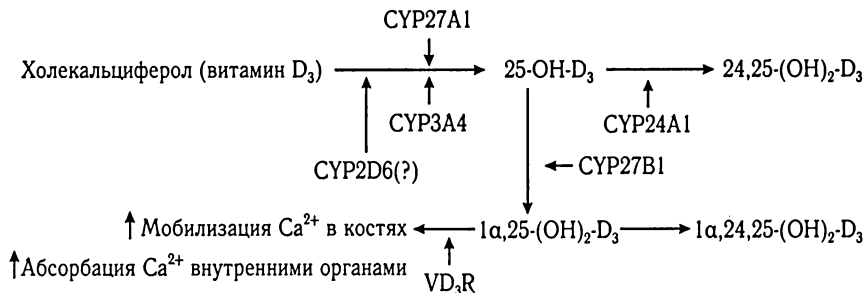


Рис. 10.5. Участие ферментов CYP450 в метаболизме витамина D₃

стадию можно блокировать предварительным введением актиномицина Д или циклогексемида, то следует предполагать, что 25-оксихолекальциферол индуцирует образование фактора, необходимого для трансформации. Мутации у человека, которые исключают активность CYP27A1 приводят к фенотипу недостаточности желчных кислот (рис. 10.3), вызывающих цереброксантомотоз, но имеют небольшое или не имеют влияния на метаболизм витамина D₃ [470].

Пять генов CYP2D были описаны [470] у мышей и крыс и только один у человека. Поскольку подсемейство CYP2D существует больше чем 450 млн. лет (раздел 8.2.11), кажется весьма вероятным, что человеческий фермент сохранил свои стероид-25-гидроксилирующие функции, наподобие CYP2D25 свиней. Ядерный рецептор фактора транскрипции 4α(HNFA4α) контролирует экспрессию гена CYP2D у человека [472]. На удивление 18-кратное повышение уровня сывороточных желчных кислот было описано для организма нокаутных мышей (лишенных гена Hnfa), что предполагает отсутствие активности CYP2D. Возможно, этот эффект объясняется взаимодействием между генами CYP2D6 и CYP27A1. Утрата экспрессии гена CYP2D6 может нарушить равновесие, что приводит к сверхэкспрессии CYP27A1, с последующим увеличением образования желчных кислот. Потеря активности CYP27A1 ведет к недостаточному образованию желчных кислот. Следовательно, определенные концентрации метаболитов желчных кислот и 25-оксивитамина

D₃ может быть информативным с целью фенотипирования пациентов.

Предполагается [460], что изоформы CYP3A также могут выполнять функции подсемейства CYP2D и свиного CYP2D25. Такое заключение основано на том факте, что CYP3A4 может выполнять функции 25- и 26-гидроксилазы 5β-холестан-3α, 7α, 12α-триола, а также 23R-, 24S-, 27-гидроксилазы 5β-холестан-3α, 7α, 12α-тетрола. Более того, у нокаутных мышей CYP27A1(—/—) всегда увеличивается активность CYP3A4. Следовательно, на рисунке 10.5 CYP3A4 и CYP2D6 включены как возможные участники окисления холекальциферола вместе с 27A1.

Мутации CYP27B1, катализирующего 1α-гидроксилирование 25-оксивитамина D₃ лежит в основе D-зависимого рахита типа I [473].

Гидроксилирование витамина D₃ и его некоторых промежуточных продуктов осуществляется митохондриальным CYP24A1, предупреждающего, кроме того, лиганд-зависимое присоединение к рецептору. Транскрипция гена CYP24A1 человека усиливается ионами кальция и избыточным количеством 1α-25-оксивитамина D₃. Дефект гена CYP24A1 мышей ведет к образованию витамина D₃, а отсюда к гипервитаминозу.

Семейство CYP26 включает три гена (по одному в каждом подсемействе). Все они катализируют гидроксилирование ретиноевой кислоты (витамина А). CYP26A1 является гидроксилазой всех типов *транс*-ретиноевой кислоты. Фермент не катализирует превращение 9-*цис*- и 13-*цис*-ретиноевой кислоты [474]. Наряду с CYP26A1 в метаболизме ретиноевой кислоты и ее производных принимает участие CYP26B1, однако биологическая роль этих ферментов пока не ясна.

Таким образом, полиморфизм ферментов, являющийся следствием полиаллелизма соответствующих генов приводит к так называемой лекарственной идиосинкразии (CYP, метаболизирующие лекарства) или к болезням (CYP, метаболизирующие эндогенные субстраты). Последние суммированы в таблице 10.10.

Таблица 10.10

Болезни, ассоциированные с мутациями в генах CYP450

CYP-гены	Болезни
CYP1B1	Первичная врожденная глаукома (буфтальм)
CYP4A, 4B	Дефекты солевого метаболизма и водного баланса, ведущие к артериальной гипертензии
CYP51,8A1	Дефекты, ведущие к нарушениям свертывания крови и воспалительным заболеваниям, ишемической болезни сердца и легочной гипертензии
CYP7A1	Устойчивая к лечению гиперхолестеринемия
CYP7B1	Тяжелая гиперхолестеринемия и неонатальное поражение печени
CYP11A1	Липоидная гиперплазия надпочечников; спорадическая врожденная гиперплазия надпочечников (СВГН)
CYP11B1	СВГН
CYP11B2	Недостаточность кортикостеронметилоксидазы (тип I и тип II); СВГН
CYP11B1, 11B2	Ферментный химеризм, вызывающий глюкокортикоидчувствительный альдостеронизм; СВГН
CYP17A1	Синдром избыточности минералокортикоидов, дефицита глюкокортикоидов и половых гормонов, сочетающийся с повышенным риском развития рака и гипертрофии простаты; СВГН
CYP19A1	Мутация с потерей функции: вирилизация женщин, гипервирилизация мужчин, СВГН. Мутация с приобретением функции: гинекомастия молодых мужчин
CYP21A2	Более чем 90 % всех врожденных гиперплазий надпочечников
CYP24A1	Гипервитаминоз D
CYP27A1	Сухожильно-мозговой ксантоматоз
CYP27B1	Витамин D-зависимый рахит (тип I)

10.2. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ ЛЕКАРСТВ

Под биологической активацией лекарственных средств подразумевают усиление их биологических свойств в процессе метаболической трансформации. Она может быть как положительной (увеличение соответствующей фармакологической активности), так и отрицательной (усиление цитотоксического действия). Последнее явление классифицируется как АДМЕ/ t (рис. 10.6) и оно будет предметом обсуждения настоящего раздела.

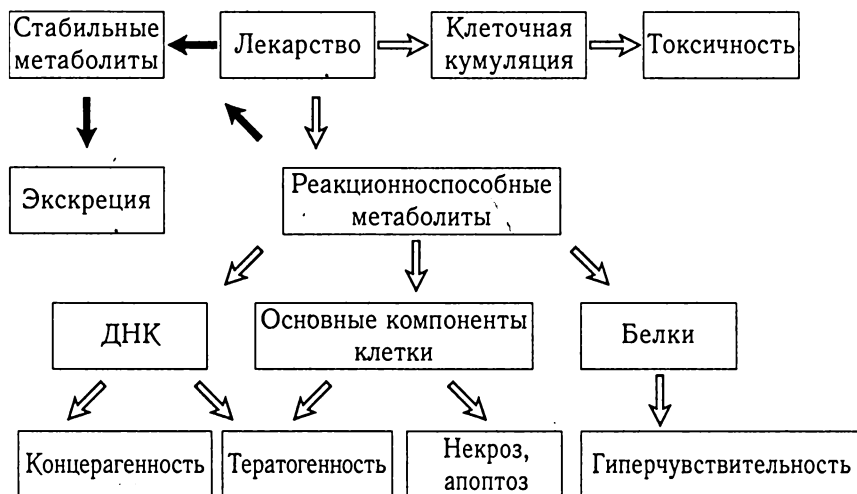


Рис. 10.6. Роль метаболизма лекарств в их токсическом действии

Лекарственные вещества могут вызывать патологические изменения в структурах наследственного фонда клеток (гены, хромосомы), при этом наступают стойкие изменения в наследственной конституции (мутации). Мутации в репродуктивных клетках (сперматозоиды, яйцеклетки) проявляются наследственным дефектом. Он может проявиться в первом же поколении, а при его рецессивном наследовании — в последующих

поколениях, если произойдет слияние двух клеток, обладающих одинаковым дефектом, возникшим под воздействием химического мутагена.

Если мутации происходят в соматических клетках, они могут развиваться патологически, становиться злокачественными. Цитотоксические противораковые средства также обладают канцерогенностью. Обычно они оказывают и тератогенное действие.

Мутагены можно условно разделить на две группы: прямого и непрямого действия. К первым относятся высокоактивные соединения, такие как лактоны, хлорэтиленамиды, эпоксиды и т. д. Эти соединения взаимодействуют с клеточными компонентами, вызывая трансформацию клетки не нуждаясь в предварительной активации в организме. Вещества непрямого действия, как правило, инертны и неспособны при физиологических условиях взаимодействовать с клеточными макромолекулами. Под воздействием клеточных ферментов не прямые мутагены в одну или несколько стадий превращаются в конечные мутагены.

Образующиеся активные метаболиты инактивируются детоксицирующими системами клетки.

В случае канцерогенных веществ их эффект зависит от реакционной способности конечного канцерогена и его стационарной концентрации в клетке [475]. Весьма важен вопрос, по каким критериям считать метаболит конечным канцерогеном. Прямые опыты на животных не всегда возможны ввиду высокой реакционной способности и, следовательно, неустойчивости метаболитов. Поэтому часто судят по косвенным признакам. Наиболее часто используется биологический метод — наличие активного метаболита определяется по образованию мутантных колоний бактерий *Salmonella typhimurium*. Это так называемый метод Эймса. Кроме того, мутации могут быть определены в культуре клеток млекопитающих. Биохимические методы основываются на определении ковалентного связывания активного метаболита с макромолекулами (чаще всего с ДНК).

10.2.1. ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ СУЩЕСТВОВАНИЯ АКТИВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

Термин химически-реакционноспособные метаболиты означает различные по происхождению вещества, которые имеют широкий интервал периода существования — от миллисекунд до нескольких часов [476].

К первой группе относятся *ультракороткоживущие* метаболиты. Они никогда не покидают фермент, на котором происходило их формирование. В то же время такие метаболиты очень быстро преобразуются в активном центре фермента в стабильное производное, которое ковалентно связывается с макромолекулой, инактивируя ее. На этом, собственно, и построены биохимические методические приемы, позволяющие идентифицировать такие метаболиты. Введение в систему фермент—метаболит какого-либо нуклеофила или ловушек интермедиатов не приводят к желаемым результатам, поскольку метаболиты могут прореагировать только после того как покинут макромолекулу. Прекурсоры таких метаболитов очень часто называют «суицидными ингибиторами ферментов». Некоторые из них с успехом используются в химиотерапии.

Вторая группа — *короткоживущие метаболиты*, которые способны покидать ферменты, формирующие их, однако все время остаются в клетке. Они очень быстро реагируют с макромолекулами и химическим, и ферментативным путем превращаются в другие метаболиты. Их определение основано на использовании метода ковалентного связывания *in vitro* или *in vivo* соединения меченого радиоактивными изотопами. В отличие от ультракороткоживущих метаболитов короткоживущие также могут быть идентифицированы с помощью соответствующих нуклеофилов. В силу того, что распространение таких метаболитов ограничено клеткой, их действие направлено на нее.

Среднеживущие метаболиты относятся к третьей группе. Они очень быстро покидают клетку, где формируются и проникают

в соседние клетки того же органа и ткани. В некоторых случаях они поступают в кровь, где могут инактивироваться.

Предполагается, что количество метаболитов этой группы — незначительное, а те представители, которые существуют (возможно, и теоретически) детектируются в крови в виде ковалентносвязанных продуктов. Очевидно, токсический эффект, обусловленный образованными метаболитами, ограничивается органом или тканью, в клетках которых они формируются. Следовательно, если метаболит образуется в клетках печени, то он поражает их ДНК, но не влияет на яичник или семенник, имеющие иное происхождение.

Четвертая группа метаболитов определяется как *долгоживущие*. Их особенностью является то, что они широко распространены в органах и тканях независимо от того, в каком участке они формируются. Их выделение из организма несколько ограничено. Они регистрируются в биологических объектах с помощью ингибиторного анализа и по количеству связавшегося вещества с макромолекулами. Исходя из сказанного, можно предположить, что эта группа метаболитов может поражать ряд жизненно важных органов, независимо от того, где соединения образуются.

К последней группе принадлежат метаболиты, которые экскретируются исключительно биллиарными и ренальными путями, что может привести к поражению кишечника или мочевого пузыря и называются *ультрадолгоживущие*.

Подводя итог рассмотренной классификации метаболитов необходимо еще раз акцентировать внимание на тот факт, что в ее основе положен период полусуществования соответствующих соединений. Следовательно, не исключена возможность отнесения метаболита к разным группам одновременно, поскольку их образование имеет место в различных тканях. Более того, один и тот же прекурсор может быть превращен в различные метаболиты в зависимости от сложившейся ситуации. В некоторых случаях имеет место каскадный механизм трансформации (*короткоживущий* → *стабильный* → *долгоживущий* →

короткоживущий). Он может осуществляться отдельно или параллельно основному процессу.

Большинство реакционноспособных метаболитов, независимо от их группы, принимают участие в электрофильных реакциях, в которых они ищут участок клетки с доступными электронами. Поэтому в литературе такие метаболиты получили название *электрофилов*.

Существует несколько путей образования ковалентных связей между метаболитом и ДНК. Если метаболитом является эпокись, то образующиеся аддукты могут быть следующими: 90 % взаимодействия осуществляется через N²-гуанин, 5 % — через N⁶-аденин, 1 % — через N⁴-цитозин. Остальная часть (4 %) реагирует с N⁷-гуанином. Такая связь не очень прочная и ее тяжело зарегистрировать в опытах *in vivo*.

Такое ковалентное связывание, как свидетельствуют литературные данные [472], является ключевым моментом в процессах инициации токсичности (канцеро- и мутагенеза). Однако, последующие биологические и генетические события, приводящие, например, к преобразованию нормальной клетки в опухоль пока не известны.

Укажем также на существование хорошо разработанного [476] математического аппарата, описывающего поведение каждого типа метаболитов в определенный отрезок времени.

Взаимодействие метаболитов с белками также относится к явлениям, определяющим цитотоксичность лекарственных средств. В этом плане менее драматической ситуацией является взаимодействие сывороточного альбумина с метаболитами лекарств. В других случаях реакционноспособные метаболиты могут модифицировать белки. Последние становятся аутоантигенами, к которым формируются аутоантитела. При их взаимодействии и возникают цитотоксические реакции.

Пролонгированное химическое взаимодействие также может привести к изменениям, вызывающим аутоиммунный ответ. Например, алкогольное поражение печени (АПП) является частым проявлением хронической алкогольной зависимости.

Это прогрессирующее заболевание характеризуется стеатозом, гепатитом, фиброзом и, в конце концов, циррозом. Развитие АПП также ассоциируется с аутоиммунными реакциями.

В отличие от других реакций гиперчувствительности, отмеченных выше, которые встречаются относительно редко, отсроченное появление этих аутоантител предполагает более опосредованную обусловленность повреждения тканей в результате постоянного воздействия. У больных с АПП выявляются циркулирующие антитела, которые реагируют с белковыми комплексами ацетальдегида и гидроксиэтила. Оба радикала образуются в результате окисления этанола и их ковалентное присоединение к белку формирует неоантигены, которые инициируют иммунный ответ. Опосредованное CYP2E1 окисление этанола важный источник этих радикалов и CYP2E1 является главным антигеном для аутоантител, выявленных у алкоголиков.

Прояснить роль этого фермента в образовании радикалов помогут CYP2E1 дефицитные мыши, которые являются удобной моделью для изучения иммунного ответа. Уровень экспрессии печеночных P450 определяется воздействием этанола. Предполагается, что повышение ферментативной активности может способствовать прогрессированию АПП. Повышенная активность CYP2E1, возникающая под действием некоторых других химических веществ (включая галогеновые анестетики), активируемых этим ферментом, может также повышать риск развития АПП.

Аутоиммунный ответ развивается под воздействием специфических лекарств, которые являются субстратами для ферментов, распознаваемых антителами. Таковыми могут быть гипотензивные (дигидролазин, тиениловая кислота) и противосудорожные препараты (фенитоин, карбамазепин), барбитураты (фенобарбитал, дисульфирам) [478].

Некоторые из CYP450, представленных в таблице 10.11 распознаются аутоантителами, ассоциированными с аутоиммунным ответом, который индуцирован лекарственными средствами.

Таблица 10.11

СУР450 человека, взаимодействующие с аутоантителами

СУР450	Состояние
1A2	Идиопатический аутоиммунный гепатит
	Аутоиммунная полигландулярная болезнь
	Лекарственно-индуцированная гиперчувствительность (дигидралазин)
	Лекарственно-индуцированная гиперчувствительность (дисульфирам)
2A6	Аутоиммунная полигландулярная болезнь
2C9	Лекарственно-индуцированная гиперчувствительность (тиениловая кислота)
2D6	Идиопатический аутоиммунный гепатит
2E1	Алкогольное поражение печени
3A7	Лекарственно-индуцированная гиперчувствительность (фенобарбитал, фенитоин, карбамазепин)
	Лекарственно-индуцированная гиперчувствительность (дисульфирам)
11A1	Аддисонова болезнь
	Аутоиммунная полигландулярная болезнь
17	Аддисонова болезнь
	Аутоиммунная полигландулярная болезнь
21	Аддисонова болезнь
	Аутоиммунная полигландулярная болезнь

Представленные результаты свидетельствуют о функциональной взаимосвязи СУР450 и иммунологической системы организмов. Наши данные [479, 480] показали, что монооксигеназная система печени изменяет свою активность при изменении иммунологического статуса организма.

Более того, ферменты гидроксилирующие ксенобиотики и эндогенные субстраты широко представлены в иммунокомпетентных органах и клетках. Наиболее изучены [481, 482] в этом плане монооксигеназы макрофагально-лимфоцитарного комплекса.

10.2.2. МОДИФИКАЦИЯ МОЛЕКУЛЫ СYP450 КСЕНОБИОТИКАМИ

В некоторых случаях возможность биоактивации СYP450 субстратов, приводящая к образованию реакционноспособных метаболитов инициирует их присоединение к гемопротеину, а отсюда и их модификации. Это в свою очередь приводит к тому, что такие ферменты становятся аутоантигенами (табл. 10.11).

Модификация молекулы СYP450 ксенобиотиками осуществляется двумя различными механизмами:

1. *Алкилированием* простетического порфирина соответствующими субстратами.

2. *Образованием лигандных комплексов* СYP450 с реакционноспособными метаболитами.

Оба механизма являются частным случаем процессов гидроксилирования субстратов, приводящих к образованию реакционноспособных метаболитов.

С химической точки зрения присоединение насыщенного углеводорода к алкену, приводящее к насыщенному углеводороду большей молекулярной массы, носит название алкилирования. Аналогичный процесс характерен и для олефинов, являющихся субстратами СYP450. Алкилирование порфирина СYP450 олефинами рассматривается как частный вариант асинхронного механизма гидроксилирования субстратов этими гемопротейнами [483]. Их механизм может быть охарактеризован следующими положениями: во-первых, в результате окисления ферментом π -связи олефина образуется реакционноспособный

метаболит. Во-вторых, этот метаболит взаимодействует с азотом порфирина (реакция алкилирования) и образует соответствующий аддукт. В-третьих, реакция алкилирования гема сопровождается инактивацией CYP450.

Механизм алкилирования гема ненасыщенными углеводородами и его связь с окислением (эпоксидированием) ксенобиотиков понятны далеко не полностью. Структуры аддуктов олефинного или ацетиленового гема формально отражают реакции взаимодействия эпокси или других метаболитов с азотом гема. Метаболическое окисление этилена, например, приводит к образованию N-(2-оксиэтил)-протопорфирина IX, который может быть получен при нуклеофильной атаке этиленэпоксида азота гема (рис. 10.7).

Анализ возможных механизмов алкилирования гема (рис. 10.7), проведенный рядом авторов [484] свидетельствует о том, что путь 1 не может быть реализован, и соответствующий аддукт не может быть получен. Об этом свидетельствует и косвенный факт [483], указывающий на то, что эпоксиды олефинов не инактивируют CYP450, а скорее даже защищают его от такого действия. Кроме того, кислород и азот гема в аддукте

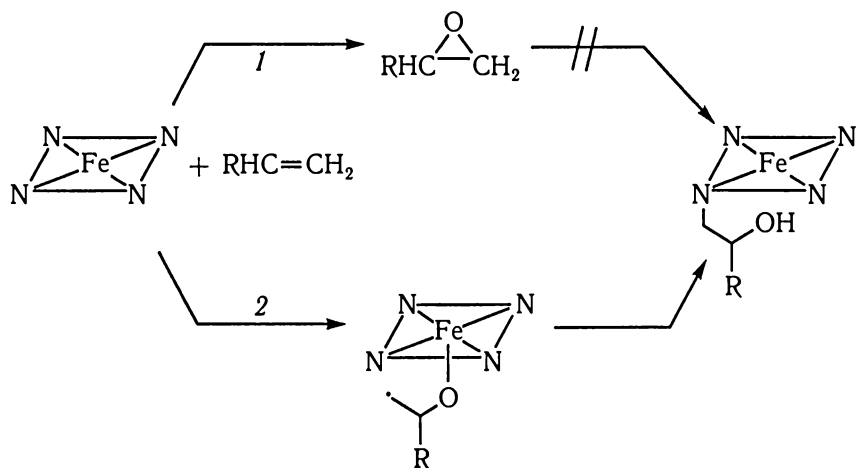


Рис. 10.7. Механизмы алкилирования гема CYP450 олефинами

располагаются по одну сторону двойной связи, а не с противоположной, что противоречит правилу взаимодействия нуклеофила с эпоксидами. Однако, источником кислорода, включенного в N-алкильную группу, является O_2 , который превращается в активную форму ферментативным путем. По-видимому, алкилирование гема, катализируется СУР450 и осуществляется в результате внедрения активной формы кислорода в π -связь, а не происходит на стадии, последующей после образования эпоксида. Очевидно процесс алкилирования гема включает образование реакционноспособного метаболита, который в одном случае взаимодействует с азотом гема (путь 2), а в другом — циклизуется до соответствующего эпоксида (путь 1). Об этом свидетельствует и тот факт, что алкилирование гема *транс*-1-[2H]-1-октенем, так же как и эпоксидирование олефинов, сопровождается сохранением их конфигурации.

Имеются предположения о том, что таким промежуточным соединением может быть ациклический радикал или соответствующий карбокатион [483].

Аналогично олефинам алкилирование гема в процессе собственного окисления осуществляют и 4-алкилдигидропиримидины. Это явление характерно не только для СУР450 микросом печени [485], но и для феррохелатазы митохондрий — фермента, внедряющего железо в протопорфирин IX [486]. Отмечено [487, 488] также алкилирование гема в реакциях окисления гидразинов, катализируемых каталазой, гемоглобином и метгемоглобином. В данном случае вначале алкилируется атом железа, а затем азот порфиринового железа (рис. 10.8).

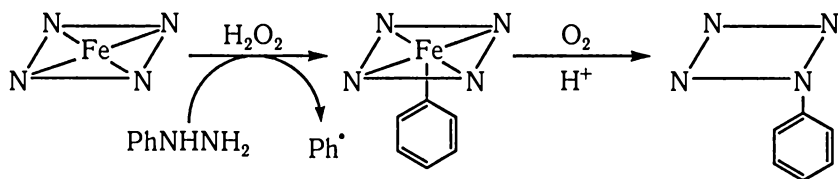


Рис. 10.8. Механизм N-алкилирования гема в процессе окисления фенилгидразина гемоглобином, метгемоглобином и каталазой

Наличие в молекуле гема четырех пиррольных колец поставило задачу перед исследователями установить, какой из их азотов наиболее реакционноспособный. Оказалось, что олефины и ацетилены исключительно алкилируют соответственно азоты пиррольных колец D и A [489]. Дигидропиридины имеют более широкий диапазон и вступают в реакции с азотами колец A, C и D [490].

Представленные данные послужили основой для создания предполагаемой топологической модели активного центра цитохрома CYP450 инактивированного олефинами и ацетиленами (рис. 10.9). В нем основная часть углеводородной цепи связана с липофильным участком над кольцом C.

Каталитическое действие фермента осуществляется в открытой части, которая располагается над железом и азотами пиррольных колец A и D. В этом случае углерод, взаимодействующий с активным кислородом в момент катализа должен располагаться также над железом.

Производные метилendioксифенила составляют группу веществ, образующих лигандные комплексы с CYP450. Как и в случае реакций алкилирования гемопroteина, образование лигандных комплексов также сопряжено с возникновением в каталитическом акте реакционноспособных метаболитов. На примере метилendioксифенила (сафрол) было показано, что такими интермедиатами могут быть карбанионы и радикалы, образующиеся в результате гомолитических реакций или ионы бензодиоксолиума [491].

Наибольшую поддержку получили данные [492] о том,

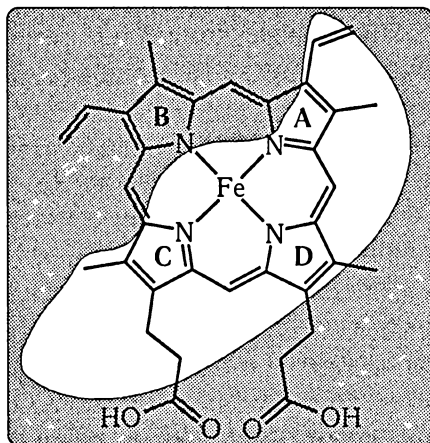
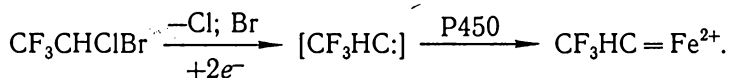


Рис. 10.9. Топологическая модель активного центра фенобарбитал-индуцированного CYP450 печени крыс инактивированного олефинами [483]

что реакционноспособным метаболитом, дающим впоследствии лигандный комплекс с CYP450, является карбен. Он образуется в результате дегидратации оксисафирола. В настоящее время осуществлен синтез и дана характеристика такого лигандного комплекса [493]. В целом комплекс довольно устойчив и достигается это за счет наличия связей: одной (Fe-карбен) и другой между Fe^{2+} и углеродом карбена. Если железо находится в окисленном состоянии (Fe^{3+}), вторая связь не образуется и комплекс становится менее устойчивым. В этих условиях различные липофильные ксенобиотики (субстраты I типа) замещают карбен в лигандном комплексе CYP450.

Некоторые ксенобиотики не окисляются CYP450, но в анаэробных условиях образуют устойчивые лигандные комплексы с гемопротеином. Например, галотан после дегалогенирования превращается в соответствующий карбен, который взаимодействует с цитохромом CYP450 [494]:



Лигандные комплексы гемопротеина и метаболитов ксенобиотиков могут также образовываться в реакциях десульфирования, т. е. замены серы на кислород в тиокарбонильных ($=\text{C}=\text{S}$) и тиофосфонильных ($=\text{P}=\text{S}$) соединениях. По аналогии с карбеном (RC:) радикал RS: называют сульфеном.

Химические реакции с участием карбенов и сульфенов различны (рис. 10.10).

Среди особенностей лигандных комплексов следует выделить еще одну характеризующую их физические свойства. Она заключается в том, что все гидрофильные π -акцепторные лиганды (карбены, SnX_2 и FeX_2 , CO) при взаимодействии с CYP450 образуют комплекс с максимумами поглощения при 455 и 427 нм. Все эти вещества получили название субстратов III типа [92]. Предполагается, что пик поглощения при 427 нм отражает сочетание взаимодействий π -акцепторных и гидрофобных

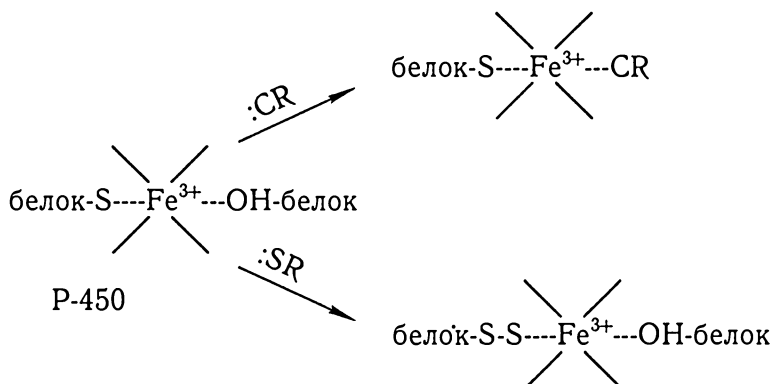


Рис. 10.10. Возможные структуры лигандных комплексов СУР450

лигандов, а 455 нм — только связь лиганд-металл. Если лигандные комплексы нестабильные, то они не дают пик при 455 нм.

Образование S-комплексов СУР450 (рис.10.10) приводит к полной потере монооксигеназной активности. Объясняется это возникающими процессами аутоокисления гемопротейна, сопровождающееся усилением перекисного окисления липидов с последующим разрушением СУР450 и мембран эндоплазматического ретикулула.

Отметим существование еще одного способа инактивации СУР450 в гидроксилазных реакциях. На стадиях распада окиси и пероксикомплексов гемопротейна образуются активные формы кислорода ($\text{O}_2^{\cdot-}$; H_2O_2), оказывающие повреждающее действие на СУР450 [495].

Ксенобиотики могут служить прегаптенами и превращаться в гаптены (реакционноспособные метаболиты) в процессе биотрансформации. После соединения гаптена с белком (ферментом) и последующим лизисом этого белка на полипептидные цепочки, содержащие гаптен, в распознавании комплекса гаптен-полипептид, как правило, доминирует специфичность гаптена. Следовательно, иммунный ответ формируется на гаптен, независимо от структуры белка-носителя, с которым он связан. Однако, специфичность ответа может значительно отличаться.

Соединение гаптена с соответствующими белками клетки делает их иммуногенными несколькими путями, механизмы которых освещены в обзоре [496].

10.2.3. МЕХАНИЗМЫ ИНДУКЦИИ CYP450

Взаимодействия между различными лекарственными средствами могут происходить на уровне конкуренции за определенный изофермент или за счет индукции их активности. Это может существенно изменить скорость и пути превращения препарата.

В целом процесс индукции ферментов в рамках ADME/*t* напоминает обоюдоострый меч. С одной стороны, индукция приводит к усилению метаболизма ксенобиотика, направленного на увеличение его полярности и скорейшего выведения из организма. С другой, в этой же ситуации может увеличиться формирование и реакционноспособных метаболитов. Налицо определенный физиологический парадокс, когда один и тот же процесс может быть для организма выгодным и вредным.

Большое количество лекарственных средств и эндогенных субстратов могут избирательно увеличивать относительное содержание различных изоформ CYP450. Несмотря на то, что процесс индукции CYP450 известен уже более сорока лет, его механизм определен благодаря широкомасштабным исследованиям CYP1A1. Как следует из таблицы 10.12, в основе индукции всех изоформ CYP450 лежит принцип увеличения транскрипции генов.

Так для CYP1A1 индукторами являются полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). Они способны присоединяться к цитозольному специфическому ПАУ-рецептору (Ah) с последующим перемещением его в ядро. Известно [497], что Ah-рецептор является белковым олигомером, состоящим из двух не идентичных субъединиц, составляющих основу

Таблица 10.12

Опосредованная рецепторами, регуляция экспрессии генов CYP450

Р450 ген	Рецептор	Действие	Лиганды
CYP1A1	Ah-рецептор	Индукция метаболизма ПАУ	ПАУ
CYP4A#	Активированный рецептор α -пролиферации пероксисом	Индукция ω -гидроксилирования жирных кислот	Жирные кислоты, DHEA
CYP2B#	Активированный конститутивный рецептор	Индукция лекарственного метаболизма	Фенобарбитал
CYP3A#	Прегнан х-рецептор	Индукция лекарственного метаболизма и метаболизма стероидов	Рифампицин, стероиды
CYP26	Рецептор ретиноевой кислоты	Индукция распада ретиноевой кислоты	Ретиноевая кислота
CYP27B	Рецептор витамина D ₃	Подавление продукции гормонов	1 α ,25-дигидрокси- витамин D ₃
CYP24	Рецептор витамина D ₃	Активация распада гормонов	1 α ,25-дигидрокси- витамин D ₃
CYP7	х-рецептор печени	Активация синтеза желчных кислот	Оксистерол
CYP7	Фарнизен х-рецептор	Подавление синтеза желчных кислот	Желчные кислоты

спираль—петля—спираль и так называемых PAS-доменов. Дальнейший транскрипционный процесс включает следующие стадии: 1) лиганд-зависимая гетеродимеризация между Ah-рецептором и Ah-рецепторным ядерным переносчиком; 2) взаимодействие

гетеродимера с ПАУ-чувствительным энхансером; 3) передача индуктивного сигнала от энхансера к соответствующему промотору CYP1A1; 4) перестройка хроматиновых структур.

Член суперсемейства ядерных гормональных рецепторов, прегнан χ -рецептор, опосредует активацию процесса транскрипции гена CYP3A, в ответ на воздействие лекарств и стероидов. Этот рецептор, очевидно, имеет видовую специфичность так как человеческий и кроличий активируются рифампицином, а крысиный — нет [498]. Другие члены семейства ядерных рецепторов стероидных гормонов PPAR (рецептор пролиферации пероксисом) опосредует индукцию гена CYP4A. В общем, эти ядерные рецепторы осуществляют присоединение комплексов в гене-мишени к отвечающим элементам, например к гетеродимер-ретиноидному χ -рецептору. Лиганд изменяет конформацию рецептора, что приводит к присоединению специфического белка (ко-активатора). Впоследствии такой мультипротеиновый комплекс стимулирует транскрипцию гена.

Индукция ферментов CYP2B фенобарбиталом также опосредована конститутивным ядерным рецептором. Однако фенобарбитал изменяет способность рецептора активировать ген-мишень за счет модуляции процесса фосфорилирования, что в свою очередь оказывает влияние на его транслокацию из цитозоля в ядро [499]. Следовательно, в данном случае для транскрипции генов CYP2B существует фенобарбитал-чувствительный промотор, содержащий отрицательные и положительные регулирующие элементы. Очевидно это специфический белок, который в фосфорилированной форме действует как положительный элемент промотора, а в дефосфорилированной — как отрицательный.

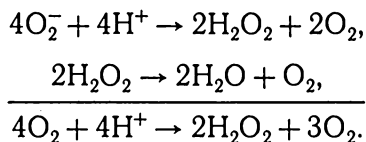
Экспрессия многих генов CYP450 очень часто приводит к накоплению соответствующих субстратов в процессе индукции ферментов. Примером может служить увеличение количества CYP3A печени человека при приеме рифампицина. Такая индукция приводит не только к увеличению скорости метаболизма рифампицина, но и ведет к увеличению клиренса других лекарств-субстратов этого фермента. Способность субстрата

одного СУР450 влиять на концентрацию другого субстрата является основой так называемого межлекарственного взаимодействия, которое может существенно осложнять лечение.

С индукцией ферментов, метаболизирующих лекарственные средства связаны механизмы гибели клеток-некроз и апоптоз [500].

В заключение отметим, что в процессе эволюции живые организмы приобрели защитные системы, обезвреживающие реакционноспособные метаболиты. Сюда относятся эндогенные тиолы (глутатион), антиоксиданты.

Очень важным процессом обезвреживания активных форм кислорода является восстановительный цикл, представленный мембраносвязанными ферментами — супероксиддисмутазой, глутатионпероксидазой и глутатионредуктазой [501]:



10.3. ФАРМАКОКИНЕТИКА

Изучение фармакокинетики (АДМЕ/РК) позволяет рассматривать взаимодействие между лекарством и организмом на уровне концентрации препарата во внутренней среде организма. Подобный подход обеспечивает более тонкий и более точный анализ закономерностей распределения лекарственных средств в организме (массоперенос), их биологической доступности, а также прямого и побочного действия.

Основы фармакокинетики являются необходимым фундаментом в экспериментальной и клинической медицине.

Поскольку любое лекарственное средство поступает в организм извне, а затем тем или иным путем удаляется, то в терминах термодинамики (Глава 1) организм является открытой системой. Тем не менее внутри организма выделяют подсистему

камер (паттерны), которую удобно рассматривать как закрытую. За исключением некоторых случаев особенно медленного всасывания препарата из области введения, большая часть времени пребывания препарата во внутренней среде организма приходится на фазу выведения (Глава 9).

О конечном эффекте действия всех процессов, ведущих к удалению препарата из организма (экскреция почками, с желчью, метаболическое превращение) можно судить по элиминации из крови. В силу этого кровь является основной тест-тканью, т. е. тканью, в которой производится определение концентрации препарата по ходу исследования.

Одним из подходов к математическому описанию фармакокинетических процессов является формализация с помощью математических моделей. Этот подход означает, что любой уровень организации живой материи может быть выбран в качестве системы, состоящей из некоторого числа единиц.

В качестве единиц в фармакокинетике принято выделять камеры. Ее можно определить как часть системы, в которой лекарственное средство распределено равномерно. Критерием правильности разделения организма на некоторое число камер является не степень приближения к анатомо-физиологической структуре (Глава 7), а исключительно принцип математического правдоподобия. Выбор той или иной модели для интерпретации результатов фармакокинетического эксперимента должен соответствовать общим принципам моделирования, используемого в прикладной математике.

Следовательно, модель — это упрощенное представление кинетических свойств препарата в организме с выделением некоторых важных для исследования параметров.

Путь к фармакокинетическим моделям прежде всего связан с определенными упрощениями. Прежде всего исследователь должен перестать относиться к организму как к совокупности различных органов, сообщающихся между собой с помощью сосудов и нервов, и посмотреть на них как на некую однородную массу. В течение становления и развития фармакокинетики как

науки было предпринято много попыток найти физические модели, которые могут служить прообразом фармакокинетических аналогий. Наиболее удачная, с нашей точки зрения, гидравлическая модель, описанная Гареттом и дополненная Чемберленом [502]. Она представляет собой цилиндр с краном на дне. Согласно этой модели количество (концентрация) препарата в плазме соответствует уровню жидкости в цилиндре. Скорость с которой лекарство элиминирует из плазмы в определенный отрезок времени отражен в модели как скорость вытекания воды из цилиндра. В математических терминах этот процесс является моноэкспоненциальным (рис. 10.11).

В целом такая гидравлическая модель имитирует ситуацию, когда препарат однократно вводится внутривенно и постепенно элиминирует из кровяного русла.

В случае перорального введения лекарственного средства, участок всасывания (желудок, кишечник) относится к периферической, а плазма крови — к центральной камере. В определенное время концентрация в центральной камере меняется,

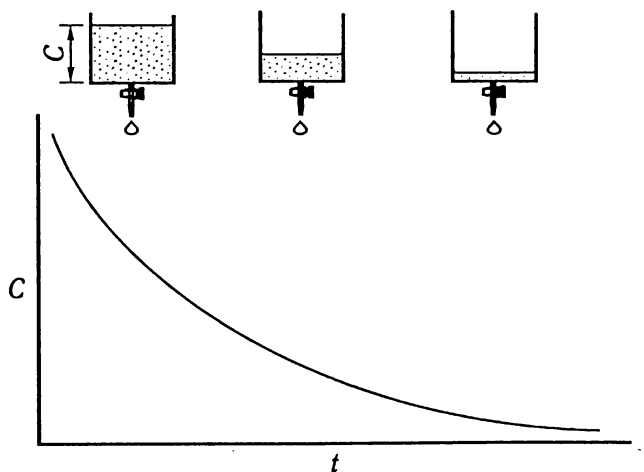


Рис. 10.11. Гидравлическая модель, иллюстрирующая процесс элиминации препарата из плазмы крови, соответственно скорости первого порядка:
 C — концентрация, t — время

что связано с двумя процессами — поступлением вещества из периферической камеры и элиминации из нее.

В этой ситуации концентрация в плазме препарата зависит от соответствующих констант всасывания k_1 и элиминации k_2 за определенный отрезок времени. Оба процесса проходят со скоростью первого порядка, а профиль концентрации препарата в плазме от времени является результирующим двух экспоненциальных процессов (рис. 10.12). Соответственно гидравлическая аналогия представлена двумя цилиндрами: A — имитирующего периферический отсек и C — центральный отсек.

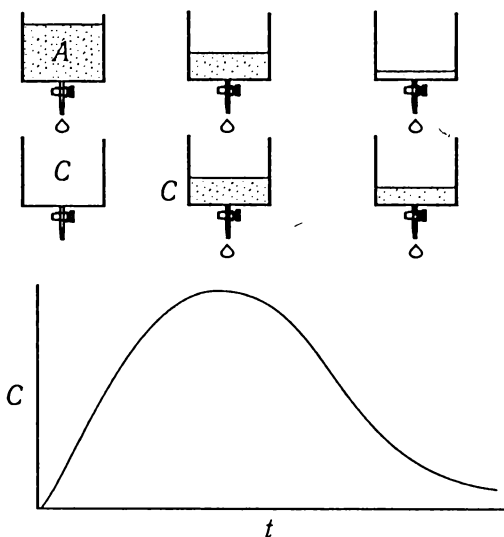


Рис. 10.12. Гидравлическая модель, иллюстрирующая всасывание препарата из места введения (A) в центральный отсек (C)

Однако гидравлическая аналогия (рис. 10.12) может быть воспринята как фармакокинетическая модель, в которой элиминация лекарства происходит в неизменном виде ренальным путем.

В том случае когда препарат удаляется из организма и посредством метаболических превращений в модель вводятся дополнительные цилиндры (рис. 10.13), указывающие на различие в скоростях процессов элиминации.

Разработана очень сложная гидравлическая аналогия, имитирующая перфузионную (физиологическую) модель (раздел 7, рис. 7.3). Отправным ее пунктом служит представление о пропорциональной связи между скоростью обратимого переноса препарата между кровью и тканями, т.е. в аналогии (рис. 10.14) жидкости и между определенными цилиндрами.

Гидравлические аналогии относятся к моделям, которые называются линейными (рис. 10.11—10.13). В них все формализуемые процессы описываются кинетическими уравнениями первого порядка (раздел 4.1), т.е. соблюдается условие пропорциональности между скоростью переноса жидкости из одного цилиндра в другой и ее количествах в этих емкостях.

Перфузионная аналогия (рис. 10.14) может быть отнесена с математической точки зрения к нелинейным, поскольку формализуемые ею процессы метаболизма и связывания препаратов обычно описываются нелинейными дифференциальными уравнениями. Однако в некоторых случаях ее можно формализовать в линейную модель.

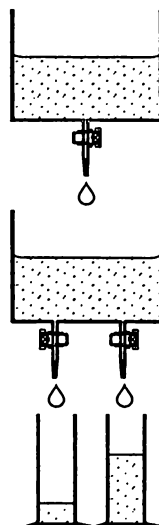


Рис. 10.13. Гидравлическая модель, включающая в себя два процесса элиминации лекарства из центральной камеры

10.3.1. ОСНОВНЫЕ МОДЕЛИ ФАРМАКОКИНЕТИКИ

Гидравлические модели могут быть преобразованы в простые программы, например, BASIC [502], которые с успехом используются в фармакокинетических исследованиях. В настоящее время общепринятым термином, описывающим процесс

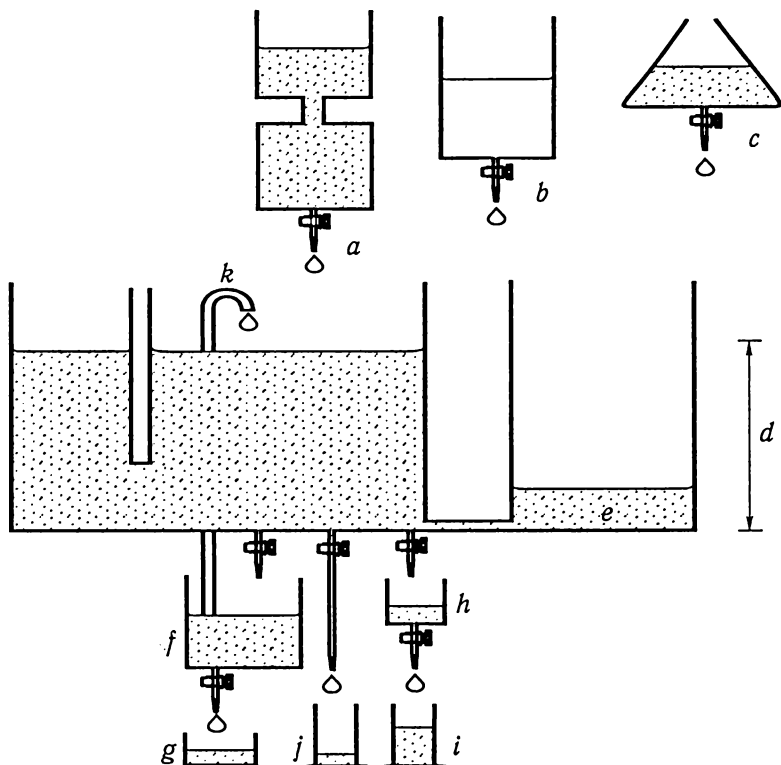


Рис. 10.14. Гидравлическая модель, иллюстрирующая различные физиологические процессы, используемые в фармакокинетическом моделировании. Плазма: *a* — всасывание со скоростью реакции нулевого порядка; *b* — всасывание со скоростью реакции первого порядка; *c* — нелинейный процесс всасывания; *d* — концентрация препарата в плазме и быстрое достижение равновесия. Ткани: *e* — концентрация препарата в тканях с медленным достижением равновесия; *f* — концентрация в желчи; *g* — концентрация в кале; *h* — концентрация метаболитов в плазме; *i* — концентрация неизменного препарата в моче; *k* — внутрипеченочная циркуляция

распределения препарата, является компартмент (камера). (Физиологический смысл этого понятия дан нами в главе 7). С фармакокинетической точки зрения это название условно, так как за ним не скрывается какого-либо пространственного ограничения в анатомическом смысле. Ее можно определить как часть системы, в которой равномерно распределен препарат.

При составлении уравнений баланса данной фармакокинетической модели следует пользоваться общими принципами, изложенными в разделах 4.1 и 4.2. В простейшем случае, когда модель состоит из одной камеры, в которую препарат поступает мгновенно в начале опыта, единственным процессом, подлежащим описанию, является элиминация лекарства (гидравлическая аналогия, рис. 10.11). Если этот процесс подчиняется закону кинетики первого порядка, то дифференциальное уравнение баланса имеет вид: $dC/dt = -k_{el}C$, а модель называется линейной.

Если модель состоит из двух камер, то для каждой из них должно быть составлено уравнение баланса и вся модель будет описываться системой из двух дифференциальных уравнений.

10.3.1.1. ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ

При рассмотрении физиологических процессов (разделы 6.6; 7.2.5; Глава 9), определяющих фармакокинетические показатели нами была дана их характеристика. С целью лучшего понимания материала нами повторяются некоторые из вышеназванных параметров, а некоторые рассматриваются впервые.

Константа скорости элиминации (обозначение — K_{el} , размерность — $ч^{-1}$, $мин^{-1}$) — параметр, характеризующий скорость элиминации препарата из организма путем экскреции и биотрансформации. В многочастевых моделях величина K_{el} обычно характеризует элиминацию препарата из центральной камеры, включающей кровь и ткани, быстро обменивающихся препаратом с кровью. Элиминацию препарата из организма в этом случае характеризует кажущаяся константа элиминации — комплексный параметр (обозначение β , размерность — $ч^{-1}$, $мин^{-1}$), связанный с другими константами модели (K_{ij} , см. ниже).

Константа скорости абсорбции (всасывания) (обозначение K_{01} , размерность — $ч^{-1}$) параметр, характеризующий скорость

поступления препарата из места введения в системный кровоток при внесосудистом способе введения.

Константа скорости перехода препарата между частями (камерами) в многочастевых (многокамерных) моделях (обозначение K_{ij} , размерность — ч^{-1} , мин^{-1}) параметр, характеризующий скорость выхода препарата из i -ой камеры в j -ю. Например, в двухчастевой модели существуют две константы скорости перехода — одна характеризует скорость перехода из центральной (первой камеры) в периферическую (вторую) и обозначается K_{12} ; другая характеризует обратный процесс и обозначается K_{21} . Отношение этих констант определяет равновесное распределение препарата. Суммарно кинетика процесса распределения между двумя камерами характеризуется комплексным параметром, который зависит от константы скоростей всех процессов, учитываемых моделью. В рамках двухчастевой модели этот параметр обозначают α , его размерность — ч^{-1} , мин^{-1} .

Константа скорости экскреции (обозначение K_e или K_{ex} , размерность — ч^{-1} , мин^{-1}) параметр, характеризующий скорость выделения препарата с каким-либо экскретом: с мочой, калом, слюной, молоком и др. В рамках линейной модели эта константа должна совпадать по величине с константой скорости элиминации в том случае, если препарат выводится из организма только в неизменном виде одним путем, например, с мочой. В других случаях величина K_{ex} равна доле от K_{el} .

Период полуэлиминации препарата (обозначение $T_{1/2}$, размерность — ч, мин) — время элиминации из организма половины введенной и поступившей дозы препарата. Соответствует времени уменьшения в два раза концентрации препарата в плазме (сыворотке) крови на участке моноэкспотенциального снижения плазменного (сывороточного) уровня препарата, т. е. в β -фазе.

Величина $T_{1/2}$ определяется суммарно экскрецией и биотрансформацией препарата, т. е. его элиминацией. Период полуэлиминации однозначно зависит от константы скорости элиминации: для одночастевой модели — $T_{1/2} = 0,693/K_{el}$, для многочастевой — $T_{1/2} = 0,693/\beta$.

Период полубсорбции (полувсасывания) препарата (обозначение $T_{1/2a}$, размерность — ч, мин) — время, необходимое для абсорбции (всасывания) из места введения в системный кровоток половины введенной дозы. Параметр используется для описания кинетики препарата в случае его внесосудистого введения и однозначно зависит от константы скорости всасывания препарата.

Период полураспределения препарата (обозначение $T_{1/2a}$, размерность — ч, мин) — условный параметр, характеризующий в рамках двухчастевой модели распределение между центральной камерой, включающей плазму крови, и периферической камеры (органы, ткани). Величина $T_{1/2a}$ соответствует времени достижения уровней препарата, равных 50 % от равновесных концентраций, которые наблюдаются при достижении равновесия между кровью и другими тканями.

Кажущаяся начальная концентрация препарата (обозначение C_0 или C^0 , размерность — ммоль/л, мкг/л, нг/мл и др.) — условный параметр, равный той концентрации, которая получилась бы в плазме крови при условии введения препарата в кровь и мгновенного распределения его по органам и тканям (при анализе одночастевой модели) или в объеме центральной камеры (при анализе дву- и многочастевой моделей). Величина C при линейной кинетике препарата в организме прямопропорциональна дозе препарата.

Стационарная концентрация препарата в плазме крови (обозначение C_{ss} , размерность — ммоль/л, мкг/л, нг/мл) — та концентрация, которая устанавливается в плазме (сыворотке) крови при поступлении препарата в организм с постоянной скоростью. В случае интермиттирующего введения (приема) препарата через одинаковые промежутки времени в одинаковых дозах используют понятие *максимальная стационарная концентрация* (C_{ss}^{\max}) и *минимальная стационарная концентрация* (C_{ss}^{\min}).

Объем распределения препарата (обозначение V_d или V , размерность — л, мл) — условный параметр, характеризующий

степень захвата препарата тканями из плазмы (сыворотки) крови. Величина V_d в рамках однокамерной модели равна такому условному объему жидкости, в котором распределяется вся попавшая в организм доза препарата, чтобы получилась концентрация, равная кажущейся начальной концентрации (C_0). Часто объем распределения относят к единице массы тела больного (G , кг) и получают *удельный объем* распределения (обозначение Δd , размерность — л/кг, мл/г). В многокамерных моделях вводят понятие *объем распределения* в i -ой камере (обозначение V_i , размерность — л, мл). Например, при анализе двухкамерной модели рассчитывают объем первой, центральной камеры (V_1), в которую входит и плазма крови. *Общий* или *кинетический объем распределения* в таких моделях (обозначение V_β , размерность — л, мл) характеризует распределение препарата после достижения состояния квазистационарного равновесия между концентрацией препарата в крови (центральной камере) и других тканях (периферических камерах). Для двухкамерной модели справедливо выражение $V_\beta = (k_{el}/\beta)/V_1$; для этой модели предложено также использовать параметр *стационарный объем распределения* (обозначение V_{ss} , размерность — л, мл), который пропорционален величине объема распределения в первой камере.

Часто объем распределения называют «кажущимся», что только утяжеляет терминологию, но не вносит дополнительных разъяснений, поскольку условность этого параметра следует из его определения.

Общий клиренс препарата (синонимы: клиренс тела, клиренс плазмы (сыворотки), плазменный (сывороточный) клиренс; обозначение Cl_t или Cl_T , размерность — мл/мин, л/час). — параметр, соответствующий объему тест-ткани, освобождающейся от препарата за единицу времени. В простейшем случае клиренс препарата — это отношение скорости элиминации всеми возможными путями к концентрации лекарства в биологических тканях.

Почечный (ренальный) клиренс препарата (обозначение $Cl_{поч}$, Cl_r , Cl_R , размерность — л/ч, мл/мин) — параметр,

определяющий скорость элиминации лекарственного препарата из организма путем его экскреции почками. Величина Cl , соответствует (условно) той части объема распределения, из которой препарат элиминирует с мочой в единицу времени.

Внепочечный (экстраренальный) клиренс препарата (обозначение Cl_{er} , $Cl_{в/поч}$, Cl_{NR} , размерность — л/ч, мл/мин) — параметр, характеризующий скорость элиминации из организма препарата другими путями помимо выделения с мочой, в основном за счет биотрансформации (метаболизма) препарата и его экскреции с желчью. Величина Cl_{er} соответствует (условно) той части объема распределения, из которой препарата элиминирует в единицу времени суммарно всеми путями элиминации, кроме экскреции почками.

Площадь под кривой «концентрация-время» (синоним — площадь под фармакокинетической кривой; обозначение AUC или S , размерность — ммоль·ч·л⁻¹, ммоль·мин·л⁻¹, мкг·ч·мл⁻¹, мкг·мин·мл⁻¹, нг·ч·мл⁻¹, нг·мин·мл⁻¹ и др.) — на графике в координатах концентрация препарата в плазме (сыворотке) крови, C_p — время после введения препарата, t'' , площадь фигуры, ограниченной фармакокинетической кривой и осями координат. AUC связан с другим фармакокинетическим параметром — объемом распределения; AUC обратно пропорциональна общему клиренсу препарата. При линейности кинетики препарата в организме величина AUC пропорциональна общему количеству (дозе) препарата, попавшего в организм. Часто пользуются площадью не под всей фармакокинетической кривой (от нуля до бесконечности по времени), а площадью под частью этой кривой (от нуля до некоторого времени t); этот параметр обозначают AUC_t .

Время достижения максимальной концентрации (обозначение t_{\max} или t_{\max} , размерность — ч, мин) — время достижения концентрации препарата в крови.

10.3.1.2. ЧАСТЕВЫЕ ЛИНЕЙНЫЕ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ

Фармакокинетические параметры рассчитываются в рамках одночастевой модели, одночастевой модели со всасыванием, двухчастевой модели, а также двухчасовой модели со всасыванием.

1. *Одночастевая модель.* В одночастевой модели весь организм представлен единственной камерой. Такое представление равносильно предпосылке о фармакокинетической однородности всех тканей, в которые способен проникать препарат. На первый взгляд, подобное представление о распределении препарата в организме находится в вопиющем противоречии с фактами. В действительности, концентрация любого препарата в крови и тканях, как правило, неодинакова, однако пренебречь этим очевидным несоответствием между теоретическими представлениями и реальной ситуацией позволяет следующее обстоятельство. Дело в том, что однокамерность модели и не предполагает одинаковые значения концентрации в тест-ткани и других тканях, объединяемых понятием камеры, а лишь свидетельствует о постоянному соотношении между уровнями препарата в них в период наблюдения за фармакокинетикой.

Существует два варианта одночастевой модели. Первый из них, наиболее простой, предусматривает мгновенное поступление всего препарата непосредственно в камеру (одночастевая модель без всасывания, рис. 10.15), второй — поступление препарата в нее из некоторого депо (одночастевая модель со всасыванием, рис. 10.16).

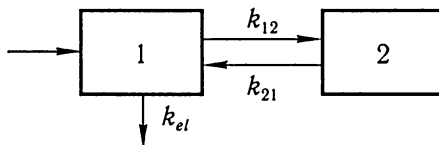


Рис. 10.15. Одночастевая модель без всасывания

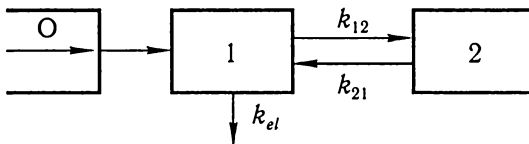


Рис. 10.16. Однокаплевая модель со всасыванием

Однокаплевая модель без всасывания описывается следующим уравнением: $C(t) = C_0 e^{-k_{el}t}$. Эту модель характеризуют следующие фармакокинетические параметры: k_{el} , $T_{1/2}$, C_{\max} , Cl_t , C_0 , V_d и AUC . Величина кажущейся начальной концентрации равна C_0 . Константу элиминации вычисляют как угол наклона прямой концентрации от времени в полупологарифмических координатах по формуле:

$$k_{el} = \left\| \frac{C_2 - C_1}{t_2 - t_1} \right\|,$$

где (C_1, t_1) и (C_2, t_2) координаты двух произвольных точек, взятых на этой прямой. Период полужизни вычисляют по формуле $T_{1/2} = 0,693/k_{el}$. Максимальная концентрация препарата — это наибольшее значение полученных при исследовании (эксперименте) концентраций. Общий клиренс является произведением константы элиминации на объем распределения, последний вычисляют из зависимости $V_d = D/C_0$, где D — доза введенного в организм вещества (препарата, яда и т. д.). Площадь под фармакокинетической кривой можно определить как

$$\int_0^{\infty} C(t) dt = \int_0^{\infty} C_0 e^{-k_{el}t} dt = \frac{C_0}{k_{el}}.$$

Однокаплевую модель со всасыванием характеризуют следующие параметры: k_{el} , k_{01} , $t_{1/2}$, $t_{1/2a}$, C_{\max} , Cl_t , C_0 , V_d и AUC .

Математически эта модель описывается формулой: $C(t) = B(e^{-k_{el}t} - e^{-k_{01}t})$, где

$$B = \frac{Dk_{01}}{V(k_{01} - k_{el})_1}.$$

Как нетрудно заметить одночастевую модель со всасыванием характеризуют практически те же параметры, что и аналогичную без всасывания, за исключением константы скорости абсорбции и периода полуабсорбции. Процесс расчета этих параметров аналогичен предыдущей модели.

Константа скорости абсорбции вычисляется методом последовательного логарифмирования.

Период полуабсорбции определяется из соотношения $t_{1/2a} = 0,693/k_{01}$.

2. *Двухчастевые модели.* Анализ кривых фармакокинетики многих препаратов показывает, что даже при условии их непосредственного поступления в тест-ткань кинетические данные не удается линейаризовать в полулогарифмических координатах. Не всегда поддаются линейаризации и данные фармакокинетики препарата после достижения его максимального уровня в тест-ткани при условии немгновенного появления в ней препарата. Это означает, что основанное на одночастевой модели упрощенное представление организма однородным пространством, в котором распределяется препарат, не соответствует кинетическим данным. В подобных случаях полагают, что в совокупности тканей и биологических жидкостей организма с фармакокинетической точки зрения можно выделить две камеры (т. е. организм рассматривается в рамках двухчастевой модели), которые отличаются степенью доступности для проникновения препарата. Поскольку проникновение препарата в ту или иную ткань зависит от ее кровоснабжения, относительно доступными для препарата обычно считают кровь, интерстициальную жидкость и сильно васкуляризованные ткани сердца, мозга, легких, печени, почек и эндокринных желез, а менее доступными — все остальные ткани. Классификация тканей по этому принципу условна, поскольку характер распределения препарата в организме зависит от многих других

факторов (растворимость в липидах, связывание в крови и тканях и пр.). Однако она помогает увязать физиологические представления с аппроксимацией фармакокинетики препарата двухчастевой моделью, центральная (1) камера, которой формализует первую группу тканей, а периферическая (2) — вторую [504]. По аналогии с одночастевой моделью, поступление препарата непосредственно в центральную камеру или в нее из депо существует двухчастевая модель без всасывания (рис. 10.17) и со всасыванием (рис. 10.18) соответственно.

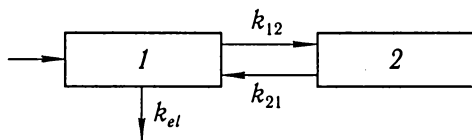


Рис. 10.17. Двухчастевая модель без всасывания

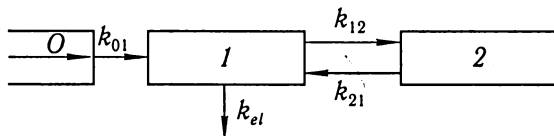


Рис. 10.18. Двухчастевая модель со всасыванием

Двухчастевая модель без всасывания описывается следующим уравнением:

$$C(t) = A_1 e^{-\alpha t} + B_1 e^{-\beta t},$$

где

$$A_1 = \frac{D(\alpha - k_{12})}{V_1(\alpha - \beta)}, \quad B_1 = \frac{D(\alpha - k_{21})}{V_1(\alpha - \beta)}.$$

Параметры, характеризующие эту модель: максимальная концентрация препарата, время ее достижения, константа элиминации, кажущаяся константа элиминации, константа скоростей перехода, период полужизни, период полураспределения, кажущаяся начальная концентрация, удельный объем распределения, объем распределения, общий объем распределения,

стационарный объем распределения, общий клиренс, площадь под кинетической кривой.

Расчет этих параметров будет приведен при описании аналогичной модели со всасыванием, т. к. он практически ни чем не отличается.

Двухчастевую модель со всасыванием характеризуют следующие показатели: максимальная концентрация препарата, время ее достижения, константа элиминации, кажущаяся константа элиминации, константа скоростей перехода, период полуэлиминации, период полураспределения, кажущаяся начальная концентрация, удельный объем распределения, константа скорости абсорбции, период полуабсорбции, период полувсасывания, объем распределения, общий объем распределения, стационарный объем распределения, общий клиренс, площадь под кинетической кривой. Эта модель описывается следующей функцией:

$$C(t) = C_0 k_{01} (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} + C^{-k_{01}t}),$$

где

$$A = \frac{k_{21} - \alpha}{(k_{01} - \alpha)(\beta - \alpha)}; \quad B = \frac{k_{21} - \beta}{(k_{21} - \beta)(\alpha - \beta)}; \quad C = \frac{k_{21} - k_{01}}{(\alpha - k_{01})(\beta - k_{01})}.$$

Основные фармакокинетические параметры рассчитываются на основе функции зависимости концентрации от времени в логарифмических координатах.

Так, логарифм кажущейся начальной концентрации препарата в крови ($\ln C_0$) определяется как точка пересечения продолжения прямой β -фазы с осью ординат, а параметр C_0 определяется как экспонента от вышеописанной величины. Константа элиминации — тангенс угла наклона прямой β -фазы ($\operatorname{tg} \gamma$). Величина периода полуэлиминации вычисляется исходя из соотношения $T_{1/2} = 0,693/\beta$.

Для определения параметров k_{01} , α используется метод последовательного логарифмирования.

Константа элиминации определяется как частное произведения величин α и β на k_{01} : $k_{el} = \alpha\beta/k_{01}$. Период полубсорбции определяется по формуле $T_{1/2a} = 0,693/k_{01}$. Удельный объем распределения является отношением введенной дозы препарата на кажущуюся начальную концентрацию. Константы скорости перехода определяются как система уравнения:

$$\begin{cases} \alpha + \beta = k_{21} + k_{12} + k_{el} \\ \alpha\beta = k_{21} + k_{el} \end{cases} \quad \begin{cases} \alpha + \beta = k_{21} + k_{12} + k_{el} \\ \alpha\beta = k_{21} + k_{el} \end{cases}$$

Период полувыведения определяется из равенства $T_{1/2\beta} = 0,693/\beta$, а период полувсасывания $T_{1/2\alpha} = 0,693/k_{01}$, объем распределения (V_1) находится из зависимости $V_{dud} = V_d / \langle \text{среднюю массу} \rangle$, общий объем распределения (V_β) вычисляется как $V_\beta = (k_{el}/\beta)V_1$.

Стационарный объем распределения (V_{ss}) рассчитывается по формуле:

$$V_{ss} = \frac{V_1(k_{21}k_{12})}{k_{21}}.$$

Общий клиренс (Cl_t) является произведением V_β на β . Площадь под фармакокинетической кривой (AUC) определяется из зависимости:

$$AUC = C_0 k_{01} \left(\frac{A}{\alpha} + \frac{B}{\beta} + \frac{C}{k_{01}} \right),$$

где

$$A = \frac{k_{21} - \alpha}{(k_{01} - \alpha)(\alpha - \beta)}, \quad B = \frac{k_{21} - \beta}{(k_{21} - k_{01})(\alpha - \beta)}, \quad C = \frac{k_{21} - k_{01}}{(\alpha - k_{01})(\beta - k_{01})}.$$

Нами разработаны компьютерные программы и методические рекомендации к ним [503], позволяющие рассчитывать фармакокинетические параметры изменения концентрации

лекарственного средства в крови или другой тест-ткани на основании наиболее широко используемых линейных частевых моделей. Методические рекомендации состоят из 2-х частей: первая является графической интерпретацией полученных исследователями результатов с помощью программы Microsoft Excel версии не ниже 5.0 (new.xlt) и выбор наиболее адекватной модели. Вторая — это программный продукт, состоящий из модулей написанных под Microsoft Excel версии не ниже 97 (farma.xlt), позволяющая получить соответствующие фармакокинетические параметры по той или иной фармакокинетической модели.

10.3.1.3. НЕЛИНЕЙНЫЕ МОДЕЛИ

Описанные в разделе 10.3.1.2 линейные модели фармакокинетики характеризовались некоторыми признаками, которые можно суммировать следующим образом [505]:

1. Площадь под кривой выведения препарата из тест-ткани является линейной функцией дозы независимо от того, вводится ли препарат непосредственно в основную (в случае многочастевой модели — в центральную) камеру или поступает в нее из подкамеры в соответствии с законами кинетики первого порядка.

2. Графики функции $C/C^0(t)$ или $C_1/C_1^0(t)$ обладают свойством симбатности, т. е. после приведения к одной и той же величине дозы фармакокинетические кривые накладываются друг на друга.

3. Фармакокинетические параметры инвариантны относительно дозы препарата.

4. Процессы переноса препарата между камерами модели и его необратимой элиминации далеки от насыщения, т. е. количество препарата в камере линейно зависит от дозы.

Если анализ данных фармакокинетики препарата указывает на невыполнение хотя бы одного из перечисленных условий,

следует думать, что истинный характер по крайней мере одного из процессов распределения препарата по организму нелинеен. Модель фармакокинетики, учитывающая нелинейность процессов (процесса) переноса препарата между камерами, называется нелинейной.

Наиболее характерными причинами нелинейности фармакокинетики препаратов являются нелинейные процессы их метаболического превращения и связывания белками крови или тканями, хотя наряду с этими двумя факторами источником нелинейности может быть насыщенный характер процессов распределения препарата в тканях или его активной секреции.

Сложность анализа фармакокинетики на основе нелинейных моделей побуждает исследователей таким образом проводить кинетический эксперимент, чтобы условия распределения препарата в организме были далеки от насыщения. Так, для феназепама удалось выбрать диапазон доз, при введении которых фармакокинетику препарата удастся формализовать линейными моделями [506].

В качестве типичной нелинейной модели можно привести пример [507] одночастевой модели фармакокинетики феназепама, элиминация которого с желчью происходит в результате метаболизма, описываемого функцией Михаэлиса-Ментен (раздел 4.2).

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ОТВЕТ

Действие вещества, развивающееся после его всасывания, поступления в общий кровоток и затем в ткани называют резорбтивным. Следовательно, заключительным актом разнообразных перемещений и трансформаций лекарственного средства в определенных фазах ADME является поступление его в биофазу действия. Под биофазой действия подразумевают чаще всего биологические мишени, взаимодействующие с лекарствами. Выяснить, где и каким образом действуют лекарственные средства, вызывая те или иные эффекты — основная задача фармакодинамики (PD).

Лекарственные средства могут связываться (с разной степенью сродства) с морфологически близкими, но функционально отличающимися молекулами-мишенями. Все молекулы-мишени лекарственных средств можно разделить на несколько категорий:

- Нерецепторные молекулы-мишени плазматической мембраны:
 - Ионные каналы (табл. 11.1);
 - Неспецифические белки и липиды плазматической мембраны;
 - Рецепторы (табл. 11.1; 11.2);
 - Ферменты (табл. 11.1);
 - Рецепторно-ионные каналы (табл. 11.2);
 - Транспортные системы (табл. 11.1);
 - Гены.

Большинство из перечисленных категорий представляют собой, исходя из принципов физико-химической фармакологии, отдельные случаи взаимодействия низкомолекулярных и высокомолекулярных веществ (Глава 3), приводящих к возникновению биологического ответа (response, R).

Биологические мишени действия лекарств

Тип мишени	Примеры лекарств, взаимодействующих с мишенями
<i>Рецепторы гормонов и нейромедиаторов</i>	
Адренорецепторы	Эпинефрин, пропранолол
Гистаминовые	Цитометидин, дифенгидрамин
Серотониновые	Цизаприд, ондастерон
Мускариновые	Атропин, бетанехол
Никотиновые	Тубокурарин
Опиоидные	Морфин
Стероидные	Кортизон, эстрадиол, тамоксифен
Инсулиновый	Инсулин
<i>Ферменты</i>	
Холинэстераза	Физостигмин
Циклооксигеназа	Аспирин
ДНК-полимераза	Ацикловир, задовудин
ДНК-токоизомераза	Ципрофлоксацин
Протеаза вируса иммунодефицита человека	Индинавир
Моноаминоксидаза	Фенелзин
Na ⁺ , K ⁺ -аденозинтрифосфатаза	Дигоксин
Ксантиноксидаза	Аллопуринол
<i>Транспортные белки мембран</i>	
Ионные каналы	Лидокаин, верапамил
Ионные транспортеры	Фуросемид, гидрохлортиазид
Транспортеры нейромедиаторов	Амитриптилин, кокаин, флюоксотин
<i>Другие макромолекулы</i>	
Липиды мембран	Амфотерицин В
Нуклеиновые кислоты	Циклофосфамид, доксорубин

Таблица 11.2

Примеры рецепторов лекарств и механизмов преобразования их сигналов

Семейство и тип рецептора	Механизм преобразования сигнала	Лиганды (лекарства)
<i>Рецепторы, сопряженные с G-белками</i>		
α_1 -Адреноэргические	Активация фосфолипазы C	Фенилэфрин (Аг)
α_2 -Адреноэргические	Ингибирование аденилатциклазы	Клонидин (Аг)
β -Адреноэргические	Стимуляция аденилатциклазы	Пропранолол (Ант)
Мускариновые	Активация фосфолипазы C	Атропин (Ант)
<i>Рецепторы — ионные каналы</i>		
Никотиновый ацетил- холиновый рецептор (n AChR)	Транспорт ионов натрия	Карбахол (Аг), тубокурарин (Ант)
ГАМК _A -рецептор	Транспорт ионов хлора	Бенздиазепины, флумазепин (Ант)
<i>Мембранно-связан- ные рецепторы</i>		
Инсулиновые рецепторы	Активация тирозинкиназы	Инсулин
<i>Ядерные рецепторы</i>		
Стероидные рецепторы	Активация генной транскрипции	Стероиды надпо- чечников
Тиреоидные гормонные рецепторы	Активация генной транскрипции	Тироксин

Примечание: Аг — агонист; Ант — антагонист

Среди известных лекарственных средств 45 % приходится на препараты, взаимодействующие с различными рецепторами, 28 % действуют на ферменты, 5 % — на ионные каналы, 2 % на ядерные рецепторы, 11 % на рецепторы гормонов и факторов и 7 % — неизвестно на какие мишени.

11.1. РЕЦЕПТОРЫ

Главную роль по важности в медицине отводят рецепторам, и это не случайно, так как среди биологических мишеней действия лекарств они представлены наиболее широко.

Рецепторы структурно подразделяют на два вида [86]. *Лиотропные рецепторы* — это белки, которые состоят из нескольких отдельных субъединиц и образуют ионный канал. В этих рецепторах связывания медиаторов вызывает быстрые конформационные изменения и дальнейшее открытие ионных каналов, что приводит к трансмембранному потоку проникающих ионов вследствие электрохимического градиента. Ионный поток постепенно уменьшается благодаря процессу диссоциации медиатора, а также в результате десенситизации рецепторов. Основными тормозными ионотропными рецепторами являются ГАМК_A-рецепторы и рецепторы глицина, действие которых опосредуется прохождением ионов хлора.

Второй группой рецепторов являются *метаботропные рецепторы*, которые состоят из одного полипептида и оказывают влияние благодаря модуляции внутриклеточных процессов. Конформационные изменения, вызванные медиатором в метаботропных рецепторах, приводят к активации рецептором ГТФ-связывающих белков (G-белков) и дальнейшему влиянию на внутриклеточную концентрацию таких вторичных посредников, как циклический аденозин-3',5'-монофосфат (цАМФ), инозитол трифосфат, арахидоновая кислота и ионы Ca^{2+} . Вследствие ряда ферментативных стадий метаботропные ответы

развиваются медленно и имеют длинную продолжительность (от нескольких секунд до часа и дольше). Десенситизация метаботропных ответов происходит благодаря ковалентным модификациям рецепторов (например, путем фосфорилирования) или вследствие обратимого (секвестрация), или необратимого удаления рецепторов из плазматической мембраны. Количество рецепторов, которые попадают под определение метаботропных, сегодня достигает более 250.

На примере ГАМК_A-рецепторов рассмотрим особенности структуры и функции *ионотропных рецепторов*.

Ряд работ [508—510] по молекулярному клонированию показали, что ГАМК_A-рецептор это гетероолигомерный гликопротеин (200-400 кД), состоящий из субъединиц семи типов (α , β , γ , δ , ϵ , π и θ) [26—30]. По крайней мере три типа субъединиц разделяются еще на подтипы (α 1—6), (β 1—3), (γ 1—3). Каждая субъединица состоит из четырех трансмембранных доменов (TM1-TM4), соединенных между собой пептидными связями (рис. 11.1, б). Амфифильный домен TM2 выстилает стенки ионного канала, проницаемого для ионов Cl^- . Селективность к ионам Cl^- и некоторым другим анионам (в частности, HCO_3^-) обусловлена наличием положительно заряженных аминокислот возле устья канала. Большинство ГАМК_A-рецепторов есть, вероятно, пентамерная комбинация $\alpha\beta\gamma$ или $\alpha\beta\delta$ субъединиц, например, $\alpha_1\alpha_1\beta_2\beta_3\gamma_2$. Считается, что ГАМК связывается с местами, расположенными на границе α - и β -субъединиц. Подтип последних существенным образом влияет на характеристики ответов, вызванных медиатором. Например, наиболее чувствительными к ГАМК являются ГАМК_A-рецепторы, которые содержат α_6 субъединицу ($\text{EC}_{50} < 1$ мкМ), а наименее чувствительными являются рецепторы, которые имеют α_3 -субъединицу ($\text{EC}_{50} > 6$ мкМ) [31].

Экспрессия α -субъединицы обуславливает наличие максимального по проводимости состояния каналов ГАМК_A-рецепторов (30 пС), в то же время при ее отсутствии проводимость не бывает больше 10—20 пС. Подтип α - и γ -субъединиц влияет

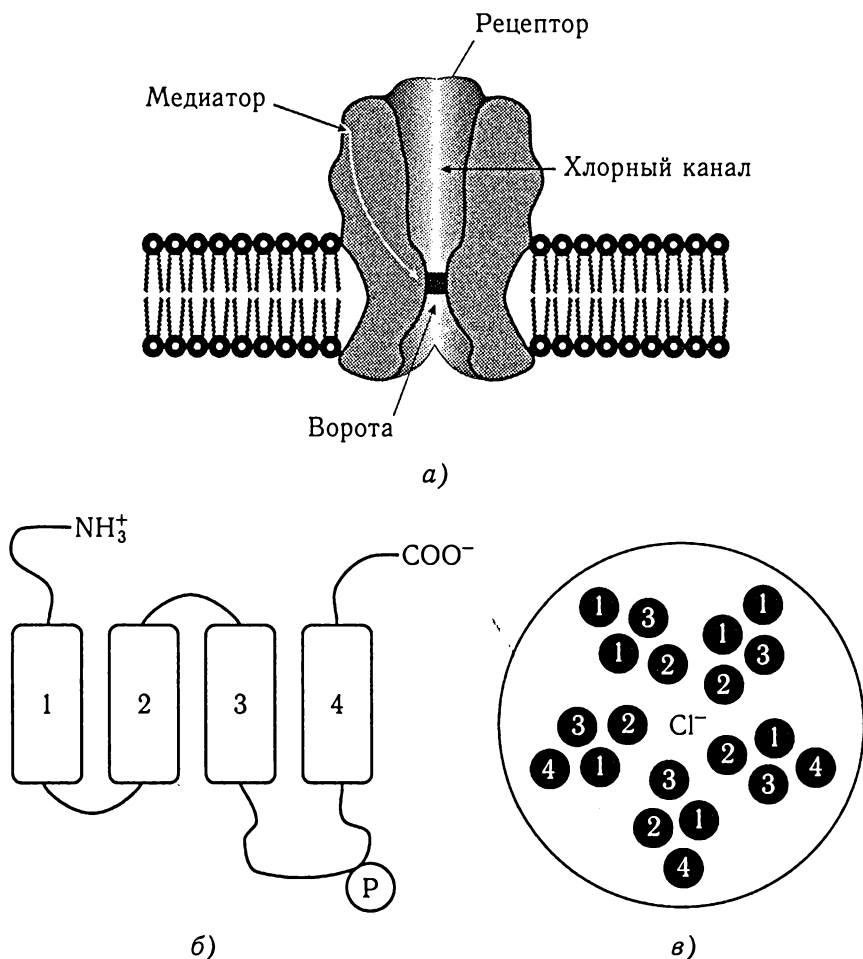


Рис. 11.1. Гипотетическая модель макромолекулярного комплекса ГАМК_A—рецептор—ионный канал: а — схематический вид рецептор-канального комплекса; б — структура отдельной субъединицы; в — схема расположений субъединиц в пентамере

также на характер модуляции ГАМК_A-рецепторов бензодиазепинами и β-карболинами [511, 512]. Функции большинства менее распространенных субъединиц подробно не изучены. В разных областях ЦНС рецепторы могут иметь строение разного типа

(например, α_1 , β_1 , γ_2 или α_3 , β_1 , γ_2) и, таким образом, обладать разными свойствами. Как и у субъединиц *n*-холинорецептора (с которыми ГАМК_A-рецепторы гомологичны на 15—20 %), у субъединиц ГАМК_A-рецептора есть четыре трансмембранных домена. Для чувствительности рецепторного комплекса к бензодиазепинам необходимо наличие γ_2 -субъединицы, что позволяет предположить, что бензодиазепиновый рецептор расположен на этой структуре или рядом.

Для выяснения структуры связывающего центра ГАМК-рецептора были применены методы использования фотоаффинной метки и мутагенеза. Первый метод основывался на внедрении метки в очищенные препараты ГАМК_A-рецепторов [³H]-мусцимола с помощью УФ излучения [513], а второй подход состоял в создании рекомбинантных ГАМК_A-рецепторов, которые содержали точечные мутации, то есть замены определенных аминокислот [514]. В этих исследованиях выделили Phe 64 α_1 -субъединицы, а также Tyr 157, Thr 160, Thr 202 и Tyr 205 β_2 -субъединицы и показали, что их замена наиболее отрицательно влияла на активацию ГАМК_A-рецепторов ГАМК и мусцимолем (но не пентобарбиталом). Более подробная информация о вторичной структуре центра связывания была получена при использовании анализа доступности замещенного цистеина (метод ДЗЦ) [515]. В этом методе в участке вероятного центра связывания нативные аминокислоты заменяют на цистеин, после чего наблюдают за эффектом (изменением величин ЕС₅₀ для рекомбинантных рецепторов), вызванных реакцией сульфгидрильных групп замещенного цистеина с N-биотиниламиноэтил-метантиосульфонатом (MTCEA-биотином). Подразумевается, что в случае замены цистеином аминокислоты, то есть составной центра связывания, такой мутантный ГАМК_A-рецептор будет иметь более низкие значения ЕС₅₀ по сравнению с нативным рецептором. Так же анализируют скорость реакции рецептора с MTCEA — биотином с целью выяснения расположения мутантных аминокислот. Поскольку изменения в чувствительности к ГАМК в мутантных рецепторах

могут быть вызваны путем модификации процесса открываний канала, что не имеет непосредственного отношения к структуре места связывания, в работе [515] были параллельно проанализированы и изменения чувствительности к конкурентному антагонисту SR-955331. Благодаря методу ДЗЦ было продемонстрировано, что место связывания ГАМК сформировано аминокислотами Phe 64, Arg 66 и Ser 68 α_1 -субъединицы, а также Ser 204, Tyr 205, Arg 207 и Ser 209 β_2 -субъединицы. На основании характера и скорости реакции рецептора с МТСЕА — биотином сделано предположение, что ГАМК_A-рецептор, возможно, представляет собой глубокий желоб, который сужается при открываниях канала.

С *метаботропными рецепторами* связывается большинство нейромедиаторов, гормонов, других медиаторов и лекарственных средств (табл. 11.2). К этим наиболее распространенным клеточным рецепторам относятся вазопрессиновые, ангиотензиновые, α - и β -адренергические, холинергические, опиатные, дофаминовые, аденозиновые, гистаминовые и многие другие рецепторы. Лекарственные средства, мишенями которых являются вышеперечисленные рецепторы, составляют обширные фармакологические группы. Очевидно, что изучение рецепторов этого типа имеет большое клиническое значение.

Каждый рецептор этого типа представляет собой полипептидную цепь, N-конец которой находится во внеклеточной среде, а C-конец — в цитоплазме. При этом сама цепь рецептора семь раз пронизывает плазматическую мембрану клетки (имеет 7 трансмембранных сегментов). Таким образом, структуру рецептора этого типа можно сравнить с нитью, пронизывающей ткань поочередно то с одной, то с другой стороны, суммарно семь раз. Специфичность того ли иного рецептора зависит не только от аминокислотной последовательности, но и от длины и соотношения «петель», выступающих вне и внутрь клетки.

Рецепторы этого типа находятся в комплексе с мембранными GTP-связывающими белками (G-белками). G-белки состоят из трех субъединиц: *a*, *b* и *g*. При связывании рецептора с лекарственным

средством и образовании комплекса лекарство-рецептор в рецепторе происходит конформационное изменение, в результате которого обмен связанного GDP на GTP на G-белке, связанном с рецептором, облегчается.

G-белок активируется на некоторое время, будучи связанным с GTP, и в этом состоянии может отделиться от связи с рецептором, взамен связываясь одной или двумя субъединицами со своими «мишенями», активируя или ингибируя их. Этими мишенями могут быть аденилатциклаза, фосфолипаза C, ионные каналы, цГМФ-фосфодиэстераза. Как правило, активированные ферменты передают и усиливают «сигнал» через системы вторичных посредников.

11.2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛЕКАРСТВА С РЕЦЕПТОРОМ

Биологический ответ на введенное лекарственное средство (ЛС) может возникнуть только в том случае когда будут осуществлены следующие процессы:

1. *Связывание ЛС с рецептором*, расположенным на клеточной поверхности или внутриклеточно.

2. *Образование ЛС-рецепторного комплекса* и изменение конформации рецептора.

3. *Передача «сигнала»* от ЛС-рецепторного комплекса клетке через различные эффекторные системы, многократно усиливающие и интерпретирующие этот «сигнал».

4. *Клеточный ответ* (первичный и вторичный).

Первым и обязательным процессом взаимодействия лекарства с рецептором является связывание с последующим образованием комплекса вещество—рецептор. Сродство вещества к рецептору, приводящее к образованию с ним комплекса обозначается термином *аффинитет*. Вещества, которые при взаимодействии со специфическими рецепторами вызывают в них

изменения, приводящие к биологическому эффекту называют *агонистами*. Если агонист, взаимодействуя с рецепторами, вызывает максимальный эффект, его называют *полным агонистом*. В отличие от последнего *частичные агонисты* при взаимодействии с теми же рецепторами не вызывают максимального эффекта. Вещества, связывающиеся с рецепторами, но не вызывающие их стимуляции, называют *антагонистами*. Если они занимают те же рецепторы, с которыми взаимодействуют агонисты, то речь идет о *конкурентных антагонистах*, если другие участки макромолекулы, не относящиеся к специфическому рецептору, но взаимосвязанные с ним, то — о *неконкурентных антагонистах*. При действии вещества как агониста на один подтип рецепторов и как антагониста — на другой, его обозначают *агонистом-антагонистом*.

Лиганд, связываясь с рецептором, должен индуцировать в нем конформационный переход, приводящий к функциональным изменениям в других частях молекулы. Природа такого перехода абсолютно неизвестна. Установлено лишь, что по крайней мере в IgE-рецепторе с высоким сродством связывание лиганда индуцирует агрегацию рецептора в плоскости мембраны, однако нет никаких указаний на то, что это характерно для всех передающих сигнал рецепторов. Хотя структурные детали гормонов или нейромедиаторов остаются неизвестными, их важные функциональные особенности сейчас более или менее ясны. При связывании агониста происходят следующие три события (в зависимости от типа рецептора).

1. Связывание агониста индуцирует открывание канала, образуемого рецептором. Примерами могут служить никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR), рецептор γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) и глициновый рецептор. Все это рецепторы нейромедиаторов, которые структурно объединены в малое суперсемейство. На основании данных о первичной структуре этих рецепторов/ионных каналов для каждого полипептида была построена модель с четырьмя трансмембранными сегментами (рис. 11.1).

2. При связывании лиганда активируется тирозиновая протеинкиназа, представляющая собой цитоплазматический домен рецептора. Обычно сам рецептор и является мишенью (происходит аутофосфорилирование), но данные о том, какие именно белки фосфорилируются и как они влияют на клетку, практически отсутствуют.

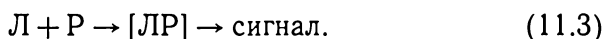
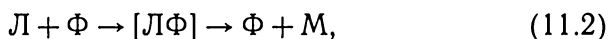
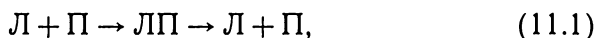
3. Рецептор образует комплекс с одной из групп мембрано-связанных GTP-связывающих белков, называемых G-белками. При связывании лиганда с рецептором в комплексе рецептор/G-белок происходит конформационное изменение, в результате чего облегчается обмен связанного GDP и GTP на G-белке. G-белок активируется на короткое время, будучи связанным с GTP, и в этом состоянии может отделиться от рецептора, причем одна или больше субъединиц G-белка могут связаться с другими мембранными белками (метаботропные рецепторы).

Если вещество взаимодействует только с функционально однозначными рецепторами определенной локализации и не влияет на другие рецепторы, то действие такого вещества считают избирательным. Основой избирательности действия является сродство (аффинитет) вещества к рецептору. Это обусловлено наличием определенных функциональных групп, а также общей структурной организацией вещества, наиболее адекватной для взаимодействия с данным рецептором, т. е. их комплементарностью (раздел 3.2).

11.3.1. НЕКОТОРЫЕ ТЕОРИИ ЛЕКАРСТВО-РЕЦЕПТОРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Несмотря на идентичность взаимодействия всех низкомолекулярных веществ с высокомолекулярными (раздел 3.2) конечный результат этого процесса — различен. Так при взаимодействии лекарства и переносчика (раздел 6.3.2) образуется комплекс, который после выполнения функции (перемещения)

вновь распадается на составные части (11.1). Если лекарство выступает в роли субстрата, то после образования «ферментно-субстратного» комплекса (раздел 4.2) освобождается продукт реакции (метаболит) и фермент (11.2). И наконец, лекарство взаимодействуя с рецептором, образует комплекс лекарство—рецептор (11.3). Такое взаимодействие стимулирует рецептор и вызывает тот или иной эффект. Вещества, обладающие такой способностью, имеют так называемую *внутреннюю активность*.



Для представителей всех трех типов белков (переносчики, ферменты, рецепторы) характерна особая «активность», т. е. узнавание лиганда (субстрата). Она основана на способности низкомолекулярных и высокомолекулярных соединений, при наличии соответствия, образовывать определенные комплексы (Глава 3). Учитывая тот факт, что лекарство может одновременно быть лигандом и субстратом для образования соответствующих комплексов, их молекула должна содержать, по крайней мере, три *фармакофорные* группы: 1) *трансфорную* (связь с транспортными белками); 2) *матобофорную* (модифицируемую ферментами); 3) *эффектофорную* (в классической литературе собственно фармакофорную), связывающуюся с рецептором. Несомненно, в некоторых случаях эти группы могут быть обособлены, в других — перекрываться.

Кроме «узнавания» молекулам ферментов характерна и другая специфичность — химическое преобразование присоединенного субстрата, обусловленная наличием в их молекуле низкомолекулярных коферментов (Глава 4).

Второй «специфичностью» рецепторов является их способность генерировать и передавать сигнал от лекарство-рецепторного комплекса клетки через различные эффекторные системы.

Учитывая большое разнообразие всех названных белковых структур мы предполагаем базы данных и их адреса, которые обобщены в таблице (см. приложение 2).

Кинетические модели, количественно и качественно составляющие «*стандартную теорию рецептора*», основаны на уравнениях ферментативной кинетики. При этом кинетика ферментативной реакции практически всегда определяется в системе, где поступление реагентов неограниченно и количество промежуточного продукта реакции может быть определено непосредственно. Это обуславливает наличие расхождений между «стандартной теорией рецептора» и параметрами его функционирования, определяемыми на практике.

Вещество может быть определено как лекарство, если оно имеет такие фундаментальные свойства как аффинность, и, в случае агонистов, специфичность и способность продуцировать эффект (эффективность).

Предложенная Кларком модель подразумевала действие вещества на рецептор по принципу «все или ничего» и не позволяла различать действие агонистов, антагонистов и обратных агонистов. Предложенная Ариенсом в 1954 году величина α , названная коэффициентом внутренней активности и определяемая, как «эффективность передачи импульса с рецептора на эффектор» [516], позволила объяснить различия в величине эффекта агонистов одного рецептора и ввести понятие «частичный агонист». С другой стороны, этот коэффициент не позволял различать изменения эффектов, зависящих от степени связывания агониста с рецептором и эффектов, вызываемых изменением собственной активности агониста. Понятие «эффективности» было введено Стефенсоном в 1956 году [517, 518]. Стефенсон предположил, что эффекты агонистов могут быть описаны с привлечением двух отдельных и независимых параметров — аффинности (сродства) и эффективности. *Аффинность* определяется как способность агониста связываться с рецептором, и может быть определена исходя из константы диссоциации K . *Эффективность* была определена как величина

кванта эффекта, продуцируемого при связывании одной молекулы лиганда с рецептором. При этом количество оккупированных рецепторов было обозначено как p , эффективность как e , а суммарная величина эффекта, продуцируемого лигандом (стимул) — S . Эти величины связаны следующими отношениями:

$$\begin{aligned} S &= pe, \\ \text{Эффект} &= f(S). \end{aligned} \quad (11.4)$$

Исходя из закона действующих масс, величину p можно определить как:

$$p = \frac{[AR]}{[R]} = \frac{[A]}{[A] + K_A}. \quad (11.5)$$

Здесь K_A — равновесная константа распада лиганд-рецепторного комплекса, $[A]$ — концентрация лиганда, $[AR]$ количество рецепторов, связанных с лигандом, $[R]$ — общее количество рецепторов. Отсюда:

$$\text{Эффект } (E) = f(S) = f(pe) = f\left(\frac{[A]_e}{[A] + K_A}\right). \quad (11.6)$$

Позднее это уравнение было преобразовано Фурготтом путем введения определения эффективности как величины e , зависящей только от свойств лиганда и названной «внутренней эффективностью». При этом $e = e/[R]$, где e — суммарная эффективность [519].

Таким образом, уравнение (11.6) принимает вид:

$$f(S) = f\left(\frac{[A]_e[R]}{[A] + K_A}\right). \quad (11.7)$$

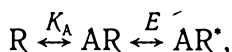
Данное уравнение является традиционным видом математического представления соотношения между эффектом

и концентрациями лиганда и рецептора в классической теории рецептора.

Важным свойством уравнения 11.7 является то, что оно содержит 4 параметра, из которых 2 относятся только к лиганду (e и K_A), а 2 — только к рецептору (R и f). Параметры e и K_A не связаны с формами рецепторов и параметрами их функционирования, поэтому они могут быть использованы для определения эффектов вещества на основании опытов на животных [520]. Благодаря этому свойству можно фармакологически классифицировать рецепторы [521].

Здесь аффинность агониста определяется независимо, а внутренняя эффективность — исходя из параметров кривой доза — эффект [522].

Предложенная в 1957 году del Castillo и Katz схема функционирования рецептора выглядела следующим образом:



где AR — лиганд-рецепторный комплекс в неактивном состоянии, AR^* — лиганд-рецепторный комплекс в активном состоянии, K_A константа диссоциации лиганд-рецепторного комплекса, E — равновесная константа реакции перехода комплекса в активное состояние [523].

В этом случае эффект (E) определяется исходя из следующего уравнения:

$$E = f \left(\frac{[RA]}{K_A + [A]} \right), \quad (11.8)$$

где $[A]$ — концентрация лиганда.

Исходя из 11.8 доля рецепторов в активном состоянии p рассчитывалась следующим образом:

$$p = \frac{E \left(\frac{[A]}{[A] + K_A} \right)}{1 + E \left(\frac{[A]}{[A] + K_A} \right)}. \quad (11.9)$$

В этой модели K_A является мерой аффинности лиганда, а E — мерой внутренней эффективности рецептор-лигандного комплекса.

Из 11.9, используя 11.4 и 11.5, была выведена зависимость:

$$p = \frac{S}{1 + S}.$$

В результате экспериментов с использованием классической теории рецептора были отработаны методики, позволяющие определить ряд свойств рецептора:

- меру аффинности агониста посредством частичного алкилирования рецептора [524];
- степень активности агониста [525];
- относительную эффективность агониста [520];
- аффинность антагониста [526];
- места связывания вещества на рецепторе [527].

Относительная эффективность агонистов, в терминах классической оккупационной теории рецептора, определяется свойствами лиганд-рецепторного комплекса и свойствами ткани, в которой расположен рецептор.

Последний фактор показывает каким образом в ткани преобразуется сигнал рецептора и зависит от количества рецепторов ткани $[R]$ и эффективности перехода стимула в ответ [521, 522].

»

11.3.2. ОККУПАЦИОННЫЕ МОДЕЛИ РЕЦЕПТОРНО-ЛИГАНДНОГО КОМПЛЕКСА

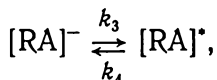
Выраженность биологических эффектов (E_i) линейно связана с количеством занятых (окупируемых) рецепторов биологически активными соединениями рецепторов, т. е. образовавшихся рецепторно-лигандных комплексов относительно исходного количества рецепторов (R_0): $E_{\max} = \beta[R_0]$, $E_i/E_{\max} = \alpha[RA]_i/[R_0]$, где E_{\max} — максимальный достижимый эффект, α и β — коэффициенты, $\alpha < 1$.

Простая оккупационная модель (ПОМ), впервые предложенная Кларком [516], описывает наиболее простые случаи взаимодействия рецепторов с полными агонистами, фармакологическое действие которых в высоких концентрациях равно E_{\max} , (т. е. $\alpha = 1$). Тогда их наличие в среде в концентрации A_i определяет развитие биологического действия: $E_i/E_{\max} = A_i/(K_A + A_i)$.

Модель предполагает конкурентные взаимоотношения агонистов с рецепторами, в процессе которых развивается результирующий эффект ($E_{\text{сум.}i}$), который можно выразить следующей формулой:

$$E_{\text{сум.}i} = \left(\sum \frac{A_i}{K_A} \right) \left(1 + \sum \frac{A_i}{K_A} \right)^{-1}.$$

Сложная оккупационная модель (СОМ) предполагает существование рецепторно-лигандного комплекса в неактивной ($[RA]^-$) и активной ($[RA]^*$) формах. Процессы конформационных переходов являются обратимыми:



где k_3 и k_4 — константы скорости процессов.

Биологический эффект агониста пропорционален доле комплекса рецептор—лиганд:

$$\frac{E_i}{E_{\max}} = \frac{\alpha([RA]^- + [RA]^*)}{[R_0]} = \frac{\alpha A_i}{K_A + A_i};$$

$$\alpha = \frac{k_3}{k_3 + k_4} = \frac{[RA]^*}{([RA]^- + [RA]^*)},$$

где α — «внутренняя активность» является характеристикой рецепторно-лигандного комплекса в активной форме — равновесная степень перехода $[RA]^-$ в активную конформацию $[RA]^*$.

Модель описывает конкурентные типы взаимодействия агонистов, в процессе которого развивается результирующий эффект ($E_{\text{сум. } i}$):

$$E_{\text{сум. } i} = \left(\sum \alpha_i \frac{A_i}{K_A} \right) \left(1 + \sum \frac{A_i}{K_A} \right)^{-1}. \quad (11.10)$$

При дальнейшем развитии классической оккупационной теории рецептора было описано понятие «рецепторного резерва». Само понятие формулировалось на основании того, что максимальный эффект может наблюдаться при неполной оккупации лигандом популяции рецепторов.

При совместном же воздействии лиганда В и лиганда А, если В имеет равновесную константу диссоциации K_B , уравнение 11.8 изменяется следующим образом:

$$E = f \left(\frac{[A]}{K_A \left(1 + \frac{[B]}{K_B} \right) + [A]} \right),$$

где $[B]$ — концентрация второго лиганда.

Аналогично, в случае совместного конкурентного воздействия трех лигандов — А, В и С, получаем:

$$E = f \left(\frac{[A]}{K_A \left(1 + \frac{[B]}{K_B} + \frac{[C]}{K_C} \right) + [A]} \right).$$

Вообще же в рамках классической оккупационной модели рецептора для оценки эффективности и определения равновесных констант антагонистов, частичных и полных агонистов были разработаны четыре основные группы методик:

1. Анализ обратимого конкурентного антагонизма. Степень оккупации рецептора агонистом определяется как функция его концентрации. В основном предполагаемое линейное соотношение выполняется, давая возможность рассчитать равновесную константу диссоциации.

2. Сравнение кривых концентрация-эффект для агонистов с различной эффективностью. Если эквивалентные концентрации веществ с различной эффективностью наносятся на график по обеим осям как реципрокные, и описано их линейное соотношение, то с учетом разности в величинах их эффективности могут быть рассчитаны равновесные константы диссоциации для реакций этих веществ с рецептором.

3. Взаимодействие веществ с различной эффективностью. При этом концентрация агониста, вызывающего определенный эффект, сравнивается с концентрацией, дающей такой же эффект при совместном действии с агонистом более низкой эффективности.

4. Использование агонистов обратимого действия. При использовании данного метода величины концентраций агонистов, вызывающих одинаковый эффект перед и после обратимого блокирования части рецепторов, сравниваются и помещаются на реципрокную шкалу. После использования данного соотношения обычно получаются результаты, хорошо соотносимые с полученными при использовании других методов.

Перечисленные методики применяются для описания лиганд-рецепторных взаимодействий в различных рецепторных системах ЦНС и в других органах и тканях.

11.3.3. АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ РЕЦЕПТОРНО-ЛИГАНДНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Конформационные изменения биологических макромолекул лежат в основе процессов, обеспечивающих жизнедеятельность организма. Любая реакция, возникающая при взаимодействии биологической мишени с лекарством реализуется за счет взаимных конформационных изменений макромолекулы и лиганда, возникающих вследствие образования специфического комплекса в активном центре.

Конформационные изменения макромолекулы на разных этапах лиганд-зависимой регуляции транскрипции лежат в основе экспрессии генов, синтеза белка на рибосомах. Функциональная активность гормональных и медиаторных рецепторов обеспечивается пострецепторными процессами, пусковым звеном которых являются изменение конформации эффекторной части рецептора, формирующейся вследствие химического взаимодействия лиганда со специфическим связывающим участком.

Вместе с тем, известны случаи, когда конформационные изменения в биологической молекуле возникают при связывании лиганда в участке, который не отвечает за основную активность (активный центр фермента или связывающий центр рецептора). При этом наблюдаются изменения в связывании лиганда со специфическим участком, а отсюда и в функциональной активности. Такой тип взаимодействия с биологической макромолекулой требует наличия особого места связывания, отличающегося от основного и вследствие этого получившего название *аллостерического* участка. В биохимии подобный механизм модификации ферментной активности описан достаточно давно, что привело к формированию современных представлений об аллостерически регулируемых ферментах [21—23].

При исследовании аллостерического взаимодействия важным фактором является применение соответствующего математического аппарата обработки экспериментальных данных.

Вначале регистрируется зависимость доза—эффект при взаимодействии лиганда с биологической мишенью в присутствии аллостерического модулятора. Определения могут проводиться в двух вариантах: *равновесного* и *неравновесного* кинетического исследования.

При равновесном анализе используется линеаризация данных, которая позволяет определить значение равновесной константы диссоциации (K_d) в присутствии тестируемого соединения и максимальную величину эффекта (E_{\max}). На практике при *положительном аллостерическом влиянии* отмечают как уменьшение K_d , так и увеличение E_{\max} . При исследовании *отрицательной аллостерической регуляции* используются те же математические приемы, что и при оценке положительной аллостерической регуляции, однако регистрируются противоположные изменения.

Неравновесные кинетические исследования, выявляющие динамику комплексообразования лиганд-рецептор, позволяют оценить константы скоростей прямой и обратной реакций.

Сформулированная в 1965 году аллостерическая модель — в дальнейшем была развита в регуляторно- и конформационно-аллостерическую модели [528].

Регуляторно-аллостерическая модель основывается на возможности образования не только комплексов RA_1 и RA_2 , но и комплекса RA_1A_2 при воздействии на рецептор R двух лигандов A_1 и A_2 одновременно. В данной модели значение коэффициента внутренней активности $\alpha > 0$ присуще агонистам рецептора, $\alpha = 0$ антагонистам, а $\alpha < 0$ — обратным агонистам [528]. Агонистами являются вещества, сдвигающие равновесие в реакции активации рецептора в сторону активного состояния, обратными агонистами — в сторону неактивного состояния [530].

Конформационно-аллостерическая модель предполагает наличие рецептора в активной конформации как в связанном, так и в свободном состояниях. Наличие «фоновой активности» объясняется присутствием рецепторов в активном состоянии, не связанных с лигандом [529].

Сейчас эти модели считаются наиболее близкими к истине вариантами описания рецепторно-лигандного взаимодействия. По мере изучения рецепторных взаимодействий для описания действия лиганда привлекаются модели со все большим количеством активных конформаций [526], однако модели, содержащие даже две активные формы рецептора, позволяют описывать большое количество экспериментальных данных [522].

Рассмотрим случай, когда один и тот же лиганд А взаимодействует с двумя различными молекулами рецептора [531].

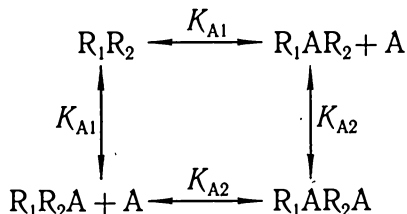
Согласно [532], определению в этом случае подлежит доля оккупированных рецепторов (RRO — relative receptor occupation):

$$\text{RRO} = \frac{[\text{RA}]}{[\text{RA}] + [\text{R}]} \quad (11.11)$$

Что можно переписать так:

$$\text{RRO} = \frac{\frac{[\text{A}][\text{R}]}{K_A}}{\frac{[\text{A}][\text{R}]}{K_A} + [\text{R}]} = \frac{[\text{A}]}{[\text{A}] + K_A} \quad (11.12)$$

Если лиганд связывается с двумя молекулами рецептора, это связывание характеризуется константами диссоциации K_{A1} и K_{A2} . Тот факт, что молекулы связываются независимо, отражен в наличии двух отдельных констант диссоциации [533]. Взаимодействие при этом проходит согласно следующей схемы [532]:



Исходя из 11.11 и 11.12, K_{A1} и K_{A2} можно выразить следующим образом:

$$K_{A1} = \frac{[A][R_1R_2]}{[R_1AR_2]} = \frac{[A][R_1R_2]}{[R_1R_2A]}; \quad (11.13)$$

$$K_{A2} = \frac{[A][R_1AR_2]}{[R_1AR_2A]} = \frac{[A][R_1R_2A]}{[R_1AR_2A]}. \quad (11.14)$$

Степень оккупации рецептора, являющаяся отношением количества связанных рецепторов к общему количеству рецепторов, может быть записана следующим образом:

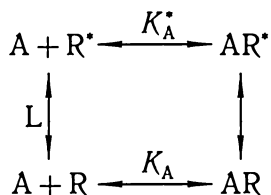
$$RRO = \frac{[R_1AR_2A]}{[R_1AR_2A] + [R_1AR_2] + [R_1R_2A] + [R_1R_2]}. \quad (11.15)$$

Комбинируя уравнения 11.9—11.11, получаем:

$$RRO = \frac{\frac{[A]^2}{K_{A1}K_{A2}}}{1 + 2\frac{[A]}{K_{A1}} + \frac{[A]^2}{K_{A1}K_{A2}}}.$$

Аналогично могут быть выведены уравнения для случаев, когда лиганд связывается с тремя и более молекулами рецептора [533].

Если в рамках конформационно-аллостерической модели активность рецептора может быть описана с привлечением одной активной формы, аффинность лиганда определяется равновесными константами диссоциации K_A^* и K_A , а константа L , равная $[R/R^*]$, определяет количество рецептора в активной форме в отсутствие лиганда [534]:

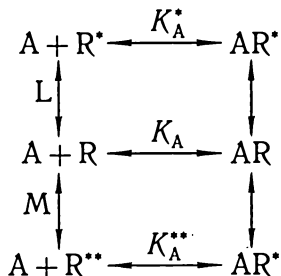


В этом случае эффективность агониста выражается уравнением:

$$f_{R^*} = \frac{\frac{1}{L} + \left(\frac{1}{LK_A^*} \right) [A]}{\left(1 + \frac{1}{L} \right) + \left(\frac{1}{K_A} + \left(\frac{1}{LK_A^*} \right) [A] \right)}. \quad (11.16)$$

Здесь взаимодействие лиганда с рецептором не подвержено влиянию каких-либо посторонних факторов.

Позже для объяснения неоднородности рецепторов было предложено использование в моделях более чем одной его активной формы. В простейшем случае, когда предполагается существование двух активных форм рецептора, R^* и R^{**} , активность агониста определяется тремя равновесными константами диссоциации: K_A , K_A^* и K_A^{**} . K_A^* является константой диссоциации комплекса R^* , а K_A^{**} — R^{**} . Эти две константы варьируют при взаимодействии рецептора с разными лигандами и активность агониста, взаимодействующего с различными эффекторными путями, будет различна [534]:



В отсутствие лиганда А распределение рецептора в активных состояниях регулируется двумя равновесными константами, L и M, причем $L = [R]/[R^*]$, а $M = [R]/[R^{**}]$. Активность агониста определяется равновесными константами диссоциации:

$$K_A = \frac{[A][R]}{[AR]}, \quad K_A^* = \frac{[A][R^*]}{[AR^*]}, \quad K_A^{**} = \frac{[A][R^{**}]}{[AR^{**}]}.$$

Если рецептор распределен между тремя не оккупированными и тремя оккупированными состояниями, то общее количество рецептора выражается уравнением:

$$[R]_{\text{общ.}} = [R] + [R^*] + [R^{**}] + [AR] + [AR^*] + [AR^{**}].$$

Исходя из 11.17, 11.18 и приведенных определений равновесных констант диссоциации рецепторно-лигандного комплекса, можно вывести уравнения, описывающие эффективность одного агониста в присутствии другого [535]:

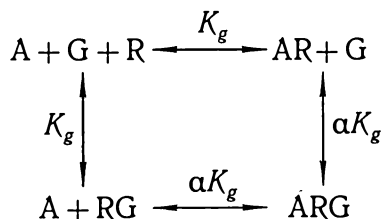
$$f_{R^*} = \frac{\frac{1}{L} + \left(\frac{1}{LK_A^*} \right) [A]}{\left(1 + \frac{1}{L} + \frac{1}{M} \right) + \left(\frac{1}{K_A} + \frac{1}{LK_A^*} + \frac{1}{MK_A^{**}} \right) [A]}, \quad (11.17)$$

$$f_{R^{**}} = \frac{\frac{1}{M} + \left(\frac{1}{MK_A^{**}} \right) [A]}{\left(1 + \frac{1}{L} + \frac{1}{M} \right) + \left(\frac{1}{K_A} + \frac{1}{LK_A^*} + \frac{1}{MK_A^{**}} \right) [A]}. \quad (11.18)$$

В данном случае уравнения, описывающие концентрацию всех форм рецептора, взаимосвязаны, что приводит к следующему: образование рецептора в одном из активных состояний увеличивает вероятность его перехода в другое активное состояние.

В системе 11.16—11.18 эффективность разных агонистов может быть описана путем подбора равновесных констант K_A , K_A^* и K_A^{**} . L и M могут использоваться для введения и исключения возможности активации рецептора в одном или обоих «фоновых» состояниях (R^* и R^{**}) при отсутствии агониста. Попыткой объединить несколько теорий функционирования рецепторов была следующая концепция: при взаимодействии лиганда с рецептором образуется неактивный лиганд-рецепторный комплекс, который затем может обратимо перейти в активное состояние. При этом скорость активации лиганд-рецепторных комплексов для рецепторов с агонистами много выше, чем скорость активации лиганд-рецепторных комплексов с участием антагонистов. Биологический ответ пропорционален при этом числу комплексов в активном состоянии. При этом достаточный экспериментальный материал для подтверждения или опровержения данной теории в настоящее время отсутствует.

Впоследствии, на основании исследований связывания глюкогона было обосновано включение в регуляторно-аллостерическую модель G-белков в качестве элемента, модулирующего эффект лиганд-рецепторного комплекса. Коэффициент внутренней активности при этом описывался как постоянная, определяющая степень связывания рецептора с G-белком. На основании исследований взаимодействия рецепторов с G-белками были сформулированы частные случаи регуляторно-аллостерической модели, такие как «трехчленная модель» действия агонистов [536], предполагающая наличие трех функционально различных активных состояний рецептора связанного с лигандом, с лигандом и различными видами G-белков или же свободного:



В этой модели много сходного с моделью, представленной ранее, но функцию R выполняет комплекс RG , а активное и неактивное состояния рецептор-лигандного комплекса, обусловленные конформационным состоянием молекулы рецептора, четко не различимы. В этой схеме K_g является равновесной константой образования комплекса RG , а α — фактор, обуславливающий взаимодействие R и G и определяющий эффективность лиганда [529]. Эта константа определяет как эффект связывания лиганда при формировании рецептор-лигандного комплекса, так и относительную аффинность лиганда при взаимодействии с R и RG . В данном случае α называется константой эффективности и считается, что $\alpha > 1$ для агонистов, $\alpha < 1$ для антагонистов и $\alpha = 1$ для обратных агонистов [529]. Наблюдаемая сила агонистов зависит от его аффинности (определяется K_d) и эффективности (определяется α), то есть степени его связывания с R и действия, производимом на процесс связывания R и G при наличии достаточного количества G в системе. Трехчленная комплексная модель также предполагает существование фонового эффекта, обусловленного спонтанной ассоциацией рецептора с G -белками при отсутствии агониста. При этом негидролизированные гуанил-нуклеотиды способны понижать спонтанную и агонист-индуцированную ассоциацию рецептора с G -белками. Таким образом, наблюдаемая аффинность агонистов понижается гуанил-нуклеотидами, что соответствует сдвигу от RG к R в модели, представлена выше.

Обратные агонисты, имеющие большую аффинность относительно несвязанного рецептора, также сдвигают равновесие системы от RG к R . Таким образом, кажущаяся активность обратных агонистов повышается в присутствии гуанил-нуклеотидов. Антагонисты не изменяют своего эффекта в зависимости от R и RG , их эффект не повышается в присутствии G -протеинов и их аффинность не модифицируется гуанил-нуклеотидами.

Рассмотренный ряд фармакологических моделей представляет собой иерархическое математическое описание (каждая предыдущая модель является частным случаем последующей)

количественных особенностей развития фармакологических эффектов при взаимодействии лигандов и рецепторов в биологических тест-объектах. При анализе результатов исследования необходимо формализовать данные опытов в соответствии с простейшей (достаточной для их описания) моделью.

Нами предложен анализ в терминах оккупационно-фармакологических моделей динамики МЭД (минимальных эффективных доз) экзогенных лигандов рецепторных систем и их смесей с различным соотношением компонентов. Он основан на следующих предположениях [537]:

а) одинаковые (минимальные, пороговые) эффекты, регистрируемые в исследуемых биологических объектах обусловлены образованием одинаковых количеств (долей от исходных количеств) рецепторно-лигандных комплексов (простая оккупационная модель), рецепторно-лигандных комплексов в активном состоянии (регуляторно-аллостерическая модель) или рецепторов и рецепторно-лигандных комплексов в активном состоянии (конформационно-аллостерическая модель);

б) соотношения между вводимыми дозами (в т. ч. МЭД) экзогенных лигандов и их концентрациями в компартментах биологических объектов, включая «биофазы действия лекарств» линейны [538].

Эти предположения не допускают возможности прямого, численного определения параметров моделей (значений констант скоростей и равновесия), однако позволяют качественно (определение типов взаимодействия) и количественно (определение безразмерных величин — отношений констант) оценить механизмы взаимодействия экзогенных лигандов (при их совместном введении в организм) с рецепторными системами, вызывающими развитие результирующих фармакологических эффектов.

11.4. ОПТИМИЗАЦИЯ ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВ НА ОСНОВАНИИ ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ИНДЕКСОВ И ПОКАЗАТЕЛЕЙ КОМПЛЕКСА «ЛЕКАРСТВО—РЕЦЕПТОР»

При прогрессивном увеличении дозы препарата его действие достигает максимальной величины, но в дальнейшем оно не усиливается, несмотря на продолжающееся увеличение дозы, однако при этом появляются нежелательные реакции. Это объясняется тем, что при использовании лекарственного средства на графике можно получить не одну, а несколько кривых, отражающих взаимосвязь дозы и каждого вызываемого эффекта. В связи с этим, если доза превысит максимальную терапевтическую, появляются новые (нежелательные) виды действия.

Следовательно, клиническая ценность каждого лекарственного средства зависит от того насколько зависимости различных эффектов от дозы перекрываются. Эрлих ввел понятие «*терапевтический индекс*» (ТИ), который представляет собой частное от деления максимальной переносимой дозы на максимальную терапевтическую. В медицинской практике это скорее теоретическая величина. Для экспериментальных животных его можно рассчитать по соотношению LD_{50}/ED_{50} .

Механизм действия лекарственного средства с точки зрения рецепторно-лигандных взаимодействий определяет направленность изменения того или иного процесса в организме и служит очень важной его характеристикой. Однако для каждого препарата существуют и количественные критерии, т. е. сила действия и его эффективность.

Сила действия — это соотношение количества (весовое) лекарственного средства и его эффекта. *Эффективность* — это способность препарата оказать максимально возможное действие.

Нами [539] на основании теоретических и экспериментальных данных обоснованы параметры взаимосвязи некоторых

фундаментальных характеристик системы «рецептор—лекарство» и критерия безопасности использования лекарственных средств — терапевтических индексов в зависимости от механизмов формирования их фармакологических и токсических эффектов.

Возвращаясь к уравнению 11.6 отметим, что при анализе процессов взаимодействия в системе «лекарство—рецептор» величина K_A является их основополагающей характеристикой. Она непосредственно не может быть определена из результатов экспериментов *in vivo* (организм, перфузированные органы и ткани) и *in vitro* (если R является составной частью субклеточных структур). Обычно определяют пропорциональные ей величины доз или концентраций, вызывающие развитие полумаксимальных эффектов D_{50} или $C_{50} - E_i / E_{\max A} = A_i (D_{50} + A_i)^{-1}$. При анализе данных, полученных *in vitro*, обычно определяют (в условиях концентрационного равновесия A) «кажущиеся» величины K_A ($K_{A, \text{ каж.}}$). В данном случае K_A тождественны $K_{A, \text{ каж.}}$ только для растворимых, но не солубилизированных R (из-за изменения физико-химических свойств макромолекул в среде определения RA и измерения A). Корректное определение K_A для рецепторов (мембранных белков или составных частей клеточных или субклеточных структур) невозможно из-за влияния на них «непосредственного окружения» (липидов мембран и т. п.). Постоянную распределения A между средой ее измерения в опыте и средой взаимодействия A и R (непосредственным окружением R) обозначим как (\approx); определению *in vivo* и *in vitro* она не подлежит. Использование величин D_{50} и $K_{A_i \text{ каж.}}$ в фармакологическом моделировании основывается на предположении об их линейной зависимости от величины K_A . Ввиду невозможности опытного определения коэффициентов соотношений (в частности \approx) корректным является только безразмерное моделирование результатов исследований [516]. Поэтому основополагающими характеристиками процессов взаимодействия лекарств и организма, а также лигандов и рецепторов *in vitro*, с нашей точки зрения, являются

не сами величины ($^1D_{50}$, $^2D_{50}$, $^1K_{\text{каж. А}}$, $^2K_{\text{каж. А}}$), определенные для различных веществ ($^1\text{А}$, $^2\text{А}$) или эффектов ($^1E_{\text{А1}}$, $^2E_{\text{А1}}$ или $^1E_{\text{1А1}}$ и $^1E_{\text{А2}}$, $^2E_{\text{А1}}$ и $^2E_{\text{А2}}$) в одинаковых условиях, а их соотношения: $^1D_{50}/^2D_{50}$, $^1E_{\text{А1}}/^2E_{\text{А1}}$, $^1E_{\text{А1}}/^1E_{\text{А2}}$ и т. д.

Еще одной фундаментальной характеристикой взаимодействия лиганда и рецептора является величина «внутренней активности» ($\alpha_{\text{А}}$) образующегося комплекса РА , (а не А). Сложная оккупационная модель предполагает существование РА в двух взаимобратимых формах (конформациях) — активной (РА^*) и неактивной (РА^-); k_3 и k_4 (уравнение 11.7) константа скоростей процесса конформационных конверсий РА .

Равновесная константа процесса конверсии рецепторно-лигандного комплекса в активную конформацию ($^*K_{\text{А}}$) определяется соотношением k_3/k_4 , а степень конверсии РА в форму РА^* соотношением:

$$\frac{^*K_{\text{А}}}{1 + ^*K_{\text{А}}} = \frac{k_3}{k_3 + k_4} = \alpha_{\text{А}}. \quad (11.19)$$

Величина биологического эффекта предполагается пропорциональной РА^* :

$$\frac{\text{РА}^*}{R_0} = \frac{E_{i,\text{А}}}{E_{\text{max}}} = \frac{\alpha_{\text{А}} A_i}{K_{\text{А}} + A_i}.$$

Возможное максимальное биологическое действие, вызываемое заведомо высокой ($A_i \rightarrow \infty$) дозой или концентрацией лиганда, равно $E_{\text{max}} \alpha_{\text{А}}$, т. е. произведению внутренней активности на величину формально достижимого максимального эффекта. Экспериментальное определение величины E_{max} проблематично. Обычно ограничиваются предположением о полном агонизме ($\alpha_{\text{А}} = 1$) лиганда с наблюдаемой в сравнительном исследовании максимальной величиной $E_{\text{max А}}$, предположив, что $E_{\text{max А}} = E_{\text{max}}$.

Для интерпретации результатов сравнительных исследований используются ТИ. Обычно ТИ определяют как отношение (т. е. безразмерную характеристику) 50 % максимально достижимых в ряду лигандов A_1 , A_2 доз или концентраций лекарств, вызывающих токсическое действие к дозам (концентрациям), способствующим развитию фармакологических эффектов.

Отсюда если

$$\begin{cases} {}^1E_i = \frac{{}^1E_{\max} A_i^m}{{}^1K_A^m + A_i^m}, \\ {}^1E_i = 0,5 {}^1E_{\max} \end{cases} \quad (11.20)$$

и

$$\begin{cases} {}^2E_i = \frac{{}^2E_{\max A} A_j^n}{{}^2K_A^n + A_j^n}, \\ {}^2E_i = 0,5 {}^2E_{\max A}, \end{cases} \quad (11.21)$$

то $A_i = {}^1K_A$; $A_j = {}^2K_A$, $A_j/A_i = {}^2K_A/{}^1K_A = \text{ТИ}_A$.

В общем случае при измерении в экспериментальных исследованиях эффектов минимальных или пороговых величин и

$$A_i = {}^1K_A \left(\frac{{}^1E_{\max A}}{{}^1E_{\max A} - E_i} \right)^{\frac{1}{m}} \text{ и } A_j = {}^2K_A \left(\frac{{}^2E_{\max A}}{{}^2E_{\max A} - E_j} \right)^{\frac{1}{n}}.$$

Это, в свою очередь, требует дополнительного определения величин для интерпретации кривых зависимостей «доза—эффект» при $m \neq n$.

Отношение ТИ к основополагающим величинам (K_A и α) альтернативно определяется механизмами фармакологического и токсического действия лигандов.

Если лиганд (А) взаимодействует только с одним типом рецепторов или с различными субъединицами рецепторно-эффекторного

супрамолекулярного комплекса (R), имеющего один тип эффектора, то фармакологические и токсические эффекты являются результатами одного и того же процесса, в основе которого лежит образование комплекса RA^* . Такие взаимодействия определяются как качественные (пороговые) изменения режима функционирования биообъекта или пороговые фармакологические эффекты. В эксперименте и в клинике регистрируются пороговые эффективные, или минимальные эффективные дозы (концентрации), вызывающие их развитие.

Если эти величины (1E_i и 2E_i) измеряются одномоментно (время опыта в обоих случаях равно t), то все фармакокинетические параметры в случае линейной кинетической схемы распределения лекарства [540] и величины распределения между непосредственным окружением R («биофазой действия» A) и тест-объектом A (обычно — плазмой крови) не влияют на определение величины ТИ.

$$ТИ = \frac{A_{i,t}}{E_{j,t}},$$

где t — время определения $A_{i,t}$ и $E_{j,t}$.

Исследования этого типа взаимодействия в системе «организм—лекарство» [538] основываются на постулированном нами ранее предположении [539], что качественные изменения в организме, вызванные введением лекарств, имеют место (реализуются) при образовании соответствующих долей (a_ϕ и $a_\tau < 1$) рецепторных комплексов в активной форме (RA^*):

$$\begin{cases} a_\phi = \frac{RA_\phi^*}{R_0}, \\ a_\tau = \frac{RA_\tau^*}{R_0}, \end{cases} \quad (11.22)$$

$$\begin{cases} RA_{\phi}^* = \frac{\alpha_A R_0 A_{\phi}}{K_A + A_{\phi}}, \\ RA_{\tau}^* = \frac{\alpha_A R_0 A_{\tau}}{K_A + A_{\tau}}, \end{cases} \quad (11.23)$$

$$\begin{cases} A_{\phi} = \frac{K_A \alpha_{\phi}}{\alpha_A - \alpha_{\phi}}, \\ A_{\tau} = \frac{K_A \alpha_{\tau}}{\alpha_A - \alpha_{\tau}}. \end{cases} \quad (11.24)$$

При этом типе взаимодействия лиганда с рецепторно-эфф- фекторной системой организма:

$$ТИ = \frac{A_{\tau}}{A_{\phi}} = \frac{a_{\tau}(\alpha_A - a_{\phi})}{a_{\phi}(\alpha_A - a_{\tau})} > 0 \quad \text{при } a_{\tau} > a_{\phi}. \quad (11.25)$$

Следует отметить существенную особенность: ТИ в отличие от пороговых доз не зависит от величины K_A . Обычно в фарма- кологии поиск новых лекарств ведется в направлении синтеза высокоактивных веществ, обладающих максимальным срод- ством к рецепторам. Однако приведенный выше анализ по- казывает, что для лигандов с рассматриваемым типом взаимо- действия с рецепторно-ионофорными комплексами, например среди производных 1,4-бенздиазепина, одновременно с возраст- анием эффективности растут и величины побочных эффектов, что не позволяет оптимизировать (обеспечить безопасность) фармакологические свойства новых лекарств [537]. Более того, сравнение ТИ двух лигандов (A_1 и A_2) с различной внутренней активностью ($a_1 > a_2 > a_{\tau} > a_{\phi}$) обнаруживает, что:

$$ТИ_2 - ТИ_1 = \frac{a_{\tau}}{a_{\phi}} \left[\frac{(\alpha_1 - \alpha_2)(a_{\tau} - a_{\phi})}{(\alpha_1 - \alpha_{\tau})(\alpha_2 - a_{\tau})} \right] > 0, \quad (11.26)$$

т. к. все множители дроби больше нуля.

Следовательно, $ТИ_2 > ТИ_1$. Следует заключить, что в ряду (A_1, A_2, \dots) чем больше внутренняя активность ($\alpha_1 > \alpha_2 > \dots$), тем ниже ТИ ($ТИ_1 < ТИ_2 < \dots$) лигандов, взаимодействующих с одной рецепторно-эффекторной системой организма.

Если же лиганд (А) взаимодействует с двумя и более типами рецепторов (рецепторно-ионофорных комплексов) (${}^1R, {}^2R, \dots$), а фармакологический и токсический эффекты (E_ϕ и E_τ) являются результатом различных процессов, в основе которых лежит образование комплексов ${}^1R^*A$ и ${}^2R^*A$, то при ${}^2E_\tau/{}^2E_{\max, A}$, где

$$\begin{cases} {}^1E_\phi = \frac{{}^1E_{\max, A} A_\phi}{{}^1K_A + A_\phi}, \\ {}^2E_\tau = \frac{{}^2E_{\max, A} A_\tau}{{}^2K_A + A_\tau}, \end{cases} \quad (11.27)$$

$$\frac{A_\phi}{{}^1K_A + A_\phi} = \frac{A_\tau}{{}^2K_A + A_\tau}, \quad \frac{{}^2K_A}{{}^1K_A} = \frac{A_\tau}{A_\phi} = ТИ_A. \quad (11.28)$$

Следует учитывать, что при ${}^1E_{\max A} = {}^1\alpha_1 E_{\max}$ и ${}^2E_{\max A} = {}^2\alpha_2 E_{\max}$ их множители (${}^1E_{\max}, {}^2E_{\max}, {}^1\alpha, {}^2\alpha$) не обязательно равны. Ввиду того, что «биофаза действия» А (непосредственное окружение 1R и 2R) различна (${}^1\alpha \neq {}^2\alpha$), в выражениях 11.27 и 11.28 A_τ и A_ϕ соответствуют концентрации А в непосредственном окружении 1R и 2R . Если осуществляется одномоментное (время опыта — t) определение содержания А в тест-объекте или (вне этого ограничения) в среде, где А находится в условиях концентрационного равновесия (перфузируемые органы и ткани, *in vitro*), выражение 11.28 принимает следующий вид:

$$ТИ_A = \frac{A_\tau(\text{тест объекта})}{A_\phi(\text{тест объекта})} = \frac{{}^1\partial {}^2K_A}{{}^2\partial {}^1K_A}, \quad (11.29)$$

где $A_\tau = {}^2\alpha A_\tau$ (тест-объекта), $A_\phi = {}^1\alpha A_\phi$ (тест-объекта).

В общем случае

$${}^1E_i = \frac{{}^1E_{\max A} A_{\phi}^n}{{}^1K_A^n + A_{\phi}^n} \text{ и } {}^2E_i = \frac{{}^2E_{\max A} A_{\tau}^m}{{}^2K_A^m + A_{\tau}^m},$$

тогда

$$\frac{A_{\tau}^m}{A_{\phi}^n} = \frac{{}^2K_A^m}{{}^1K_A^n},$$

где $n = \tau$ или $n = \tau = 1$.

ТИ не зависит от избранных для определения величин 2E_i и 2E_i и внутренних активностей комплексов 1RA и 2RA (${}^1\alpha$ и ${}^2\alpha$). Если при определении ТИ использовали величины ${}^1E_{\max}$ и ${}^2E_{\max}$ (а не ${}^1E_{\max A}$ и ${}^2E_{\max A}$), то при ${}^1E_{\phi}/{}^1E_{\max} = {}^2E_{\tau}/{}^2E_{\max}$.

$${}^2\alpha {}^1K_A A_{\tau} - {}^1\alpha {}^2K_A A_{\phi} = A_{\tau} A_{\phi} ({}^1\alpha - {}^2\alpha),$$

при ${}^1\alpha = {}^2\alpha$ $ТИ_A = A_{\tau}/A_{\phi} = {}^2K_A/{}^1K_A$;

$$ТИ_A = \frac{A_{\tau}}{A_{\phi}} = \frac{{}^1\alpha {}^2K_A}{{}^2\alpha {}^1K_A} + \frac{A_{\tau}}{{}^1K_A} \left(\frac{{}^1\alpha - {}^2\alpha}{{}^2\alpha} \right),$$

при ${}^1\alpha \neq {}^2\alpha$.

Во всех случаях A_{τ} и A_{ϕ} несопоставимы с A_{τ} (тест-объекта) и A_{ϕ} (тест-объекта) ввиду возможных различий величин ${}^1\alpha$ и ${}^2\alpha$ (не определяемых в опыте), аналогично уравнениям 11.27 и 11.28.

Следовательно, ТИ лекарств, фармакологические и токсические эффекты которых являются результатом их взаимодействий с различными рецепторными системами организма, не зависят от внутренних активностей образующихся рецепторно-лигандных комплексов, а определяются отношением их равновесных констант диссоциации, значениями коэффициентов распределения лигандов между биосубстратом (тест-объектом),

в котором осуществляется определение его концентрации, и биофазами действия. ТИ лекарственных веществ этого типа — величины безразмерные, но комплексные, и для структурно-функционального моделирования использование их недопустимо. Область применения ТИ лекарств этого типа несколько ограничена и может включать в себя только функциональное моделирование, на основании которого осуществляется описание границ их безопасного использования в фармакотерапевтических целях без анализа определения механизмов, количественных особенностей процесса и т. п.

11.5. ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ФАРМАКОДИНАМИКОЙ И ФАРМАКОКИНЕТИКОЙ (PD—PK)

В фармакокинетике (PK) исследуются процессы изменения концентрации препарата в организме с течением времени после однократного или длительного введений. Обычно фармакокинетические модели (раздел 10.3) описывают концентрацию лекарства как функцию дозы и времени. Существуют так называемые фармакодинамические модели (PD), которые по существу независимы от времени и отражают связь между концентрацией и эффектом.

Следовательно, в фармакокинетические и фармакодинамические модели входит общий параметр — концентрация, и они могут быть скомбинированы для описания общей зависимости типа «доза—эффект».

Фармакологический эффект воздействия биологически активных веществ или лекарственных препаратов на организм количественно зависит от введенной дозы, и в простейшем случае можно было бы записать зависимость эффекта только от одного параметра — введенной в организм дозы:

$$E = f(D).$$

Однако в такой сложной системе как LADMER концентрация молекул лекарства в органе-мишени и, следовательно, на рецепторе зависит от множества факторов: биодоступности введенного вещества; интервала между его введениями или приемами; констант скоростей всасывания, распределения, метаболизма и выведения; объема распределения препарата. В результате в правую часть уравнения должно попадать множество переменных:

$$E = f(D, t, F, V_d, k_i).$$

Символы в правой части выражения говорят о существовании сложных взаимоотношений между фармакодинамическими и фармакокинетическими параметрами при создании моделей действия лекарственных веществ. Установить связь между ними — значит получить возможность анализировать или даже регулировать величину эффекта, изменяя тот или иной параметр [541].

Фармакокинетический анализ позволил создать специальные методы и приемы количественного сопоставления концентрации лекарственных веществ, находящихся в организме с величиной фармакодинамического эффекта. Они дают возможность использовать компартментное моделирование для одновременного описания фармакокинетики и фармакодинамики лекарственного вещества. Такая модель состоит из обычной фармакокинетической модели, которая связана с компартментом фармакологического эффекта константой скорости первого порядка. Компартмент фармакодинамического эффекта не влияет на свойства фармакокинетической модели, а просто соотносит камеру эффекта (фармакодинамическую камеру) с концентрацией препарата в одной из камер фармакокинетической модели. Количество препарата в камере эффекта соотносится с наблюдаемым фармакологическим эффектом с помощью простой модели, адекватно описывающей эффект препарата по всему диапазону концентраций и основанной на гиперболической зависимости, которую используют для согласования фармакокинетических и фармакодинамических данных:

$$E = \frac{E_{\max} C}{EC_{50\%} + C},$$

где E_{\max} — максимальное значение эффекта при полном насыщении рецептора, $EC_{50\%}$ — концентрация вещества в эффекторном компартменте модели, вызывающая 50 % эффект от E_{\max} .

Такие зависимости широко используются в других областях моделирования, например при описании кинетики ферментов (Михаэлис—Ментен) или количественной оценке степени связывания молекул лекарств с белками плазмы крови или тканей, а также взаимодействию «лиганд—рецептор» (Главы 3, 4).

Отметим, что интерпретировать один и тот же набор данных всегда можно с помощью различных вариантов моделей. Это связано прежде всего с тем, что существует несколько этапов переноса препарата из плазмы крови в биофазу вплоть до наблюдаемого эффекта препарата. Чрезмерное упрощение и исключение ключевых этапов перераспределения препаратов может привести к неправильной трактовке ситуации. Простейшая связь существует там, где наблюдается прямая корреляция между концентрацией в плазме крови и эффектом. В этом случае его нарастание и уменьшение идет параллельно изменениям концентрации в плазме крови. При этом промежуточные процессы протекают быстро и не влияют на линейность корреляции. Моделируются подобные явления довольно просто: достаточно установления констант пропорциональности, связывающих концентрацию и эффект.

Вследствие того, что эффект препаратов измеряется в условиях нестационарного состояния (неустановившегося равновесия между содержанием препарата в плазме крови и тканях, в которых препарат оказывает свое фармакологическое действие), наблюдается отставание между достижением максимальной концентрации в плазме крови и моментом наступления максимального эффекта. Поэтому эффект, соответствующий определенной концентрации, в период нарастания концентрации

ниже, чем эффект, соответствующий той же концентрации, на нисходящей части кривой зависимости концентрации препарата в плазме крови от времени. В связи с этим график зависимости эффекта препарата от его концентрации в плазме крови выглядит в виде петли, которую называют *петлей гистерезиса* [541].

В этой связи актуальной задачей является разработка методов моделирования и анализа, поиск экспериментальных фармакологических моделей, позволяющих взаимосвязать кинетику процессов образования рецепторно-лигандных комплексов в эффекторных компартментах организмов с динамикой «пострецепторных» последствий процессов изменением параметров функционирования целостной биосистемы, то есть фармакологических эффектов.

Рецепторные макромолекулы могут пребывать в нескольких функционально-активных состояниях. Фундаментальным вопросом становится установление количества рецепторов в активных конформациях, что обуславливает фармакологический эффект, особенно после того как было показано, что один тип рецепторов может проявлять разные типы реакции с агонистами [542]. Отсюда необходимость в усовершенствовании методики изучения *in vivo* действия агонистов, обратных агонистов и антагонистов.

Кроме того, некоторыми лигандами (модуляторами) могут быть индуцированы конформационные состояния рецептора, которые проявляют свое присутствие не в виде непосредственного физиологического ответа, а другим путем. Агонисты же, благодаря селективной афинности относительно различных конформаций, могут эти конформации перераспределять. В частности, многочисленные опытные данные свидетельствуют о том, что ГАМК-рецептор имеет агонист- и антагонист-аффинные конформации при связывании. Таким образом, оккупационные фармакологические модели могут быть ключом к данному направлению рецепторной фармакологии [543].

Если при воздействии лиганда на рецептор характеристическое время изменения содержания лиганда в биофазе действия

много больше характеристического времени рецепторно-лигандного взаимодействия, взаимодействие может быть интерпретировано как «быстрообратимое». Тогда кинетика функционирования рецепторно-лигандной системы однозначно определяется фармакокинетическими характеристиками препарата. В рамках такого подхода функционирование ГАМК-рецепторной системы ЦНС может быть исследован *in vivo* на основании исследования фармакокинетики бенздиазепинов и судорожных агентов.

Перспективным направлением в моделировании быстрообратимых эффектов *in vivo* в экспериментах на животных является внутривенная инфузия лигандов исследуемого рецептора на фоне введения его агонистов и (или) антагонистов [530]. При этом эффект регистрируется в форме минимальных эффективных доз вводимого внутривенно вещества (например, судорожного агента). К преимуществам данного метода исследования можно отнести возможность представления данных как в альтернативной, так и в градуированной формах [544]; минимальные эффективные дозы определяются состоянием организма в конкретный момент времени опыта (0,5—1 мин) и оптимальны для изучения временной динамики эффекта и зависимостей «доза—эффект» агонистов медиаторных систем [545—547]; слабое влияние концентрации вводимого вещества и, следовательно, объема вводимого раствора на величину минимальных эффективных доз; независимость (в большинстве случаев) величин минимальных эффективных доз от скорости введения судорожного агента [548—550].

При определенных условиях внутривенной инфузии лекарств возможно достижение линейного соответствия между временем инфузии, вводимой дозой лекарства и концентрацией в центральной камере (крови) кинетической схемы его распределения и в биофазе действия [551].

Соблюдение этих условий позволяет использовать инфузию некоторых физиологически активных веществ и их смесей для определения механизмов их взаимодействия с рецепторно-эффекторными системами организма. В ряде случаев возможна

также оценка механизмов действия произвольно вводимых во внутреннюю среду организма лекарств на основании определения их модулирующего действия на фармакологические эффекты.

Регистрация показателей судорожного припадка (минимальные эффективные дозы) при инфузии коразола не зависит от скорости его введения [544]. Нами было отмечено, что значения величин регистрируемых показателей судорожного припадка также инвариантны (в широких пределах) скорости введения коразола, биксукуллина и пикротоксина, но не тиосемикарбазида. Концентрация судорожного агента в растворе, а следовательно, и объем вводимых растворов также несущественно влияют на значения ДКТС и ДТЭ. Например, через 1 ч после введения мышам барбитала натрия (160 мг/кг в/б) его в 1 %-ном растворе ДКТС и ДТЭ коразола составили $183,5 \pm 14,2$ и $457,0 \pm 27,3$ мг/кг, а при введении его в 2 %-ном растворе — $185,1 \pm 14,5$ и $443,4 \pm 23,3$ мг/кг [544].

Следующий этап, предшествующий исследованию взаимосвязи фармакокинетики и фармакодинамики быстрообратимых эффектов, — определение формы зависимости доза—концентрация в плазме крови (тест-объекте) и биофазе действия (головном мозгу), а также отношения концентраций плазма крови/головной мозг в различных временных интервалах исследования.

Необходимо отметить, что целесообразность моделирования на основании данных содержания общего радиоактивного материала (в случае меченных радиоактивными изотопами лекарств) в плазме крови и биофазе действия (головном мозге) нуждается в дополнительном обосновании ввиду того, что многие препараты в организме подвергаются интенсивной биотрансформации и продукты их метаболизма могут обладать различной фармакологической активностью. Поэтому нами [544, 552, 553] предложена схема определения всех метаболитов, состоящая из ряда последовательных этапов.

В связи с тем, что для любого момента времени сила фармакологического ответа — однозначная функция количества

препарата в центральном отсеке (биофазе действия), нами изучалась взаимосвязь противосудорожного действия препаратов не только с дозами введенного вещества, но и с содержанием его в головном мозге экспериментальных животных. При этом необходимо одномоментное определение выраженности фармакологического эффекта и концентрации исходных препаратов и их метаболитов в биофазе действия.

Необходимым этапом в моделировании взаимосвязи фармакокинетики и фармакодинамики является также установление формы зависимости концентрация—эффект при соотнесении «эффекторного отсека» (биофазы действия) к конкретной области обмена кинетической схемы распределения [544]. Выше нами было показано, что форма зависимости доза—эффект представлена гиперболой первого порядка. Однако если даже к сказанному прибавить заключения о линейной зависимости «доза—концентрация» и о том, что головной мозг и плазма крови могут быть описаны как единый отсек кинетической схемы распределения, экспериментального решения требуют следующие вопросы: 1) является ли головной мозг (как кинетический отсек схемы распределения) адекватным «биофазе действия» или в схему распределения необходимо вводить фиктивный периферический «эффекторный отсек»? 2) являются ли величины E_{\max} и d_{50} (C_{50}) постоянными в течение опыта?

Теория и конкретные примеры соотнесения эффекта центральному (периферическому) отсеку кинетической схемы распределения, при выражении зависимости эффекта от концентрации уравнением Хилла [554] (гипербола n -го порядка) представлены в работе [555]. Достаточно показательным методом [555] признано изучение формы зависимости эффект—концентрация в диапазоне исследования. Отсутствие значительного гистерезиса опытных данных [555] свидетельствует о том, что противосудорожный эффект бенздиазипинов является концентрационно-центральным относительно кинетической схемы распределения соединений.

Значительная информативность данных полученных при использовании метода внутривенной инфузии лигандов

ГАМК_A-рецепторов позволила нам рекомендовать его в качестве одного из скрининговых методов при доклиническом исследовании биологически активных веществ с противосудорожным типом действия [556].

С врачебной точки зрения оптимальный режим лечения должен обеспечить максимальный лечебный эффект при минимальном риске побочного действия. Для большинства препаратов показана более тесная связь между фармакологическим эффектом и концентрацией, чем между эффектом и дозой. Успехи клинической фармакологии в последние годы позволяют вплотную подойти к количественному анализу связи концентрация—эффект для различных терапевтических групп препаратов, что позволяет управлять их лечебным эффектом.

Строго говоря, лучше всего контролировать лечение на основе данных о концентрации препарата в биофазе действия. Однако истинная концентрация в биофазе действия пациента бывает известна лишь в редких случаях, а поэтому фармакокинетические модели, включающие в качестве одной из камер биофазу действия, являются до сих пор единичными. В клинической фармакологии эту трудность обходят, допуская наличие линейного отношения между количеством препарата в биофазе действия и крови. Если подобное допущение не слишком противоречит реальным условиям, то оно позволяет разрабатывать оптимальный режим лечения на основе управления уровнем препарата в крови, где легко проверить соответствие расчетных и опытных данных.

Задачу оптимизации лечения в терминах PD—PK можно определить как создание такого режима введения препарата, при котором его уровень в крови будет колебаться в границах заданного диапазона.

В клинической фармакологии, среди множества проблем, сопровождающих такого рода исследования, наиболее характерной является выбор модели. Выбор того или иного вида фармакодинамической модели определяется характеристиками конкретного препарата, необходимой точностью прогноза фармакологического эффекта, а также способом введения препарата [557]. Вид

функции, связывающей эффект и концентрацию в месте действия, зависит от диапазона имеющихся данных об эффекте и вычислительных средств, которыми располагает исследователь. При значениях эффекта от 20 до 80 % от максимального используется логарифмическая функция, при величине эффекта, значительно меньшей максимального значения, — линейная зависимость, а для описания эффекта с насыщением на всем диапазоне его изменения наиболее приемлемой является функция Хилла или функция произвольного вида [554].

Для многих лекарственных средств фармакологический эффект однозначно зависит от концентрации этих препаратов и/или их метаболитов в плазме крови. Если при этом невелики случайные колебания эффекта, может быть построена модель, т. е. найдено соответствующее уравнение, связывающее эффект и концентрации. В свою очередь динамика концентраций может быть предсказана (при произвольном режиме дозирования) с помощью соответствующих фармакокинетических моделей [505]. В этих моделях особую роль играет первая (центральная) камера, соответствующая плазме крови и всем быстро обменивающимся с кровью жидкостям. Этот так называемая модель, определяемая центральной камерой.

Модель такого рода заведомо не может быть пригодной для описания эффекта непосредственно после внутривенного введения. В этом случае рекомендовано [505, 557] использовать модели с эффектом, определяемым периферическими камерами.

В более сложных ситуациях, когда эффект проявляется в тканях, скорость перераспределения препарата в которые ниже скоростей распределения в межтканевую жидкость, возникает петля гистерезиса между концентрациями, измеренными в плазме крови, и наблюдаемым эффектом. Общая концепция моделирования в этом случае заключается в использовании классической компартментной модели, сопряженной с эффекторной камерой, и выборе формы уравнения, связывающего концентрацию в эффекторной камере и эффект. Этот модельный подход позволяет описать связь между концентрацией и эффектом с помощью

гипотетической «эффекторной камеры». Эти модели равным образом способны описать не только параллельную связь «концентрация—эффект», но и более сложные зависимости, приводящие в ином случае к возникновению гистерезиса [541, 558].

Неэквивалентность различных моделей становится наиболее заметной при попытке прогнозировать эффект после интермиттирующего введения.

Интермиттирующее, или повторяющееся, введение лекарственных средств является основным методом их применения. В этих условиях задача оптимизации схемы дозирования обычно сводится к нахождению такого соотношения между нагрузочной и поддерживающей дозами, а также интервалом дозирования, при котором концентрация препарата в крови колеблется между минимальным эффективным и максимальным допустимым уровнями. К настоящему времени приемы оптимизации схем интермиттирующего дозирования разработаны лишь для тех случаев, когда фармакокинетику лекарственного средства удастся интерпретировать в рамках линейной модели [505].

В случае одночастевой модели по мере интермиттирующего введения уровень лекарственного средства в крови постепенно возрастает и при достаточно большом количестве повторных введений колеблется в одних и тех же пределах. Очевидно, что фармакокинетика препарата в пределах первого интервала описывается обычным уравнением одночастевой модели (раздел 10.3). В момент повторного введения концентрация препарата в крови складывается из остаточного уровня, создающегося через время после введения нагрузочной дозы и уровня, обусловленного введением препарата в поддерживающей дозе.

Соответствующие модели разработаны нами [559, 560] и в экспериментальной фармакокинетике.

Несмотря на целый ряд имеющихся недостатков для строгого решения задачи оптимизации, уже принципиальная возможность усовершенствования режима лечения на основе фармакокинетического моделирования служит залогом будущих успехов в этой области лекарственной терапии.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРИНЦИПОВ И ПОДХОДОВ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ ФАРМАКОЛОГИИ В РАЗРАБОТКЕ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Разработка оригинального лекарства (R&D) — уникальный мультидисциплинарный процесс, направленный на создание нового терапевтического агента с максимально полезными и безопасными свойствами. В мировой практике он включает две функционально связанные стадии: 1) изучение (Research, discovery); 2) внедрение (Development).

Расходы, затрачиваемые на синтез и скрининг биологически активных веществ, а в последствие на доклинические, клинические испытания потенциального препарата, а также маркетинговые исследования и рекламу составляют 400—650 млн. американских долларов. Продолжительность перечисленных работ — 12—15 лет.

Внедрение нового лекарственного средства включает две основные фазы: 1) доклиническое; 2) клиническое изучение.

1. *Доклиническое исследование* (от 2 до 4 лет) подразделяется на химические, фармацевтические, метаболические и токсико-фармакологические испытания.

После получения положительных результатов предварительного фармакологического скрининга для данного химического соединения (или, другими словами, когда наблюдаются фармакологические эффекты, предсказанные на основании анализа структуры молекулы этого соединения) синтезируют и исследуют аналогичные химические соединения, несколько отличающиеся по своей структуре от первоначального вещества. Основная цель этого этапа химических исследований — добиться максимально выраженных фармакологических свойств.

Однако при проведении этих исследований специалисты часто сталкиваются с появлением совершенно неожиданных свойств синтезированных соединений, что, в свою очередь, открывает новые направления научно-исследовательской деятельности. На этой стадии исследований важно идентифицировать соединение с максимально выраженными фармакологическими свойствами, после чего рассматривается вопрос о целесообразности патентования этого вещества и способа его получения, а само соединение подвергается дальнейшему скринингу его фармакологических и биохимических свойств.

Фармацевтические исследования проводятся на всех стадиях разработки и внедрения нового лекарственного средства. В большинстве случаев после предварительного определения активности в экспериментах *in vitro* новое активное вещество используется в дальнейших фармакологических, фармакокинетических или токсикологических исследованиях в виде раствора или суспензии. Затем, по мере накопления новых данных, форма препарата усложняется и совершенствуется. Необходимость разработки той или иной формы препарата определяется многими факторами: требованиями к типу действия препарата (местное или системное), всасываемости препарата и его беспрепятственному прохождению к органам-мишеням, а также требованиями к схеме и режиму терапии этим препаратом [561].

Целью разработки лекарственной формы препарата является экспериментальный подбор оптимальной формы препарата, в виде которой впоследствии данный препарат будут получать больные. Разработка каждой из форм препарата представляет собой отдельную задачу. Так, для стабилизации свойств препарата в растворенном состоянии требуется добавление специальных компонентов, а для поддержания необходимого уровня pH раствора — добавление веществ с буферными свойствами. Препараты для парентерального введения должны быть стерильными, апирогенными и не должны содержать видимых примесей посторонних частиц. Вещества в виде суспензий склонны к седиментации вследствие нестабильности этого физического

состояния, поэтому для такой лекарственной формы следует разработать специальный состав компонентов и добавок, препятствующих седиментации. Для эмульсий характерно наличие других специфических проблем, поэтому в состав этой лекарственной формы входят специальные натуральные или синтетические эмульгаторы, снижающие поверхностное натяжение на границе масло-вода. Твердые лекарственные формы изготавливают обычно в виде таблеток или капсул, причем таблетки представляют собой наиболее часто используемую лекарственную форму. К преимуществам таблеток и капсул можно отнести возможность точного подбора дозы, стабильность и простоту производственного процесса, а также легкость транспортировки и удобство применения препаратов в этой лекарственной форме. Капсулы представляют собой порошкообразную или жидкую (неводную) субстанцию, помещенную внутрь твердой или мягкой (желатиновой) оболочки. Скорость высвобождения препаратов в твердой лекарственной форме обычно регулируют путем добавления специальных дополнительных компонентов.

Доклинические исследования безопасности применения препарата, а также доклинические токсикологические испытания *in vitro* и *in vivo* (на животных), необходимы для того, чтобы оценить действие препарата на центральную и вегетативную нервную системы, сердечно-сосудистую систему, на желудочно-кишечный тракт и на дыхательную, выделительную и эндокринную системы [562]. Целью токсикологических исследований является оценка мутагенности и генотоксичности препарата *in vitro*, а также токсических эффектов препарата при проведении испытаний на двух видах животных с использованием двух способов однократного или повторного (1 неделя; 1, 3 и 6 месяцев) введения препарата. На этой стадии следует проводить также исследования токсического воздействия препарата на репродуктивную систему (если впоследствии предполагается включать женщин детородного возраста в программу клинических исследований). Кроме того, следует проводить более длительные испытания на животных (до 52 недель), если данный

препарат предназначен для постоянного применения. На последнем этапе доклинических исследований (когда уже получены доказательства эффективности применения данного препарата у людей и проведены все основные токсикологические исследования) проводят исследования канцерогенности препарата с использованием мышей и крыс. В любом случае, количество экспериментов на животных следует ограничивать до минимума, требуемого для достоверной оценки риска применения препарата.

Перед началом каких-либо испытаний нового препарата на людях должны быть проведены тщательные исследования процессов ADME, результаты которых позволяют оценить особенности всасывания препарата, его распределения, метаболизма и экскреции, а также выявить потенциально опасные эффекты, возникающие при применении данного препарата. Данные этих исследований имеют также большое значение для оценки соотношения преимущества/риск для данного препарата, без знания которого препарат нельзя использовать в дальнейших испытаниях на людях.

2. *Клиническое изучение* (от 6 до 8 лет). Подготовка препаратов для проведения клинических исследований представляет собой еще одну, ключевую стадию процесса разработки и внедрения новых лекарственных средств. Как правило, такие исследования являются двойными-слепыми, поэтому этикетки для препаратов, используемых в этих исследованиях должны быть разработаны в строгом соответствии с требованиями, предъявляемыми соответствующими международными и национальными организациями, контролирующими качество проведения подобных исследований. Исследования биоэквивалентности разных лекарственных форм препаратов являются важной частью клинических исследований, поскольку позволяют сравнить эффективность конечной лекарственной формы препаратов, предназначенных для распространения на рынке лекарственных средств, с теми формами, которые были использованы при проведении клинических исследований [563].

Цель фармацевтических исследований — разработать оптимальную лекарственную форму препарата, в виде которой данный препарат можно производить в промышленных масштабах. Для достижения этой цели необходим перенос технологии производства с лабораторного уровня «ноу-хау» на уровень действительно промышленного производства, позволяющего выпускать буквально тонны упаковок данного препарата в строгом соответствии с международными стандартами.

В большинстве стран клиническое испытание новых лекарственных веществ обычно проходит 4 фазы:

1 фаза. Проводится на небольшой группе здоровых добровольцев. Устанавливаются оптимальные дозировки, которые вызывают желательный эффект. Целесообразны также фармакокинетические исследования, касающиеся всасывания веществ, периода их полужизни, метаболизма. Рекомендуется, чтобы такие исследования выполняли клинические фармакологи.

2 фаза. Проводится на небольшом количестве больных (обычно до 100—200 пациентов) с тем заболеванием, для лечения которого предлагается данный препарат. Детально исследуется фармакодинамика (включая плацебо) и фармакокинетика веществ, регистрируются возникающие побочные эффекты. Эту фазу апробации рекомендуется проводить в специализированных клинических центрах.

3 фаза. Клиническое (рандомизированное контролируемое) испытание на большом контингенте больных (до нескольких тысяч наблюдений). Подробно изучается эффективность (включая двойной слепой контроль) и безопасность веществ. Специальное внимание обращается на побочные эффекты, в том числе аллергические реакции и токсичность препарата. Проводится сопоставление с другими препаратами этой группы. Если результаты проведенного исследования положительны — материалы представляются в официальную организацию, которая дает разрешение на регистрацию и выпуск препарата для практического применения. В нашей стране — это Государственный фармакологический центр

МЗ Украины, решения которого утверждаются министром здравоохранения.

4 фаза. Широкое исследование препарата на максимально большом количестве больных. Наиболее важны данные о побочных эффектах и токсичности, которые требуют особенно длительного, тщательного и масштабного наблюдения. Кроме того, оцениваются отдаленные результаты лечения. Полученные данные оформляются в специальный отчет, который направляется в ту организацию, которая давала разрешение на выпуск препарата. Эти сведения важны для дальнейшей судьбы препарата (его применения в широкой медицинской практике).

Смысл последовательного проведения испытаний от 1-й к 4-й фазе заключается в постепенном расширении объема исследований, что позволяет уменьшить риск возможного отрицательного воздействия препарата на больного и более тщательно определить показания и противопоказания к его применению.

В ряде случаев для получения более исчерпывающей информации о новом препарате прибегают к многоцентровым международным исследованиям.

Качество препаратов, выпускаемых химико-фармацевтической промышленностью обычно оценивают с помощью химических и физико-химических методов, указанных в Государственной фармакопее. В отдельных случаях, если строение действующих веществ неизвестно или химические методики недостаточно чувствительны, прибегают к биологической стандартизации.

Доклинические и клинические исследования проводятся в строгом соответствии со стандартами *GLP* и *GCP*, соответственно.

12.1. КОНСТРУИРОВАНИЕ И СКРИНИНГ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Известно, что всего лишь одно из 10 000 веществ с предполагаемой терапевтической активностью (экстрагируемых,

синтезируемых или тестируемых в исследовательских лабораториях) проходит весь путь от разработки до внедрения в клиническую практику. Все кандидаты в препараты, как правило, подвергаются скринингирующему исследованию на животных с помощью набора тестов, предназначенных для выполнения интересующих исследователя эффектов. Подобный скрининг в настоящее время представляет собой очень сложное и дорогое исследование.

Соответствующий скрининг предполагает сведение к минимуму риска, сопровождающего этот этап исследования, так как ошибка, допущенная в нем, влечет за собой большие финансовые потери. Здесь имеется ввиду обнаружение недостатков у кандидата в доклинических и особенно в клинических испытаниях.

Основными причинами неудач, с которыми сталкивается исследователь в процессе внедрения в медицинскую практику оригинальных веществ относятся следующие [564]: неудачные фармакокинетические и биофармацевтические показатели (40 %), отсутствие надлежащей эффективности (30 %), токсичность (21 %), коммерческие причины (8 %).

Следовательно, в процессе конструирования таких препаратов или их скрининга были допущены серьезные ошибки. Для того, чтобы исключить подобные недоразумения на стадии конструирования лекарственных средств используются различные методические приемы. Один из них — выяснение зависимости между химическим строением веществ, их физико-химическими свойствами и биологической активностью (*био-физико-химические свойства*). Установление таких закономерностей позволяет проводить синтез препаратов более целенаправленно. При этом важно выяснить, какие химические группы и особенности структуры определяют основные эффекты исследуемых веществ.

В последние годы наметились новые подходы к созданию лекарственных препаратов. В этом случае за основу берется не биологически активное вещество, как это делалось ранее, а биологическая мишень, с которой оно взаимодействует (рецептор,

фермент и т. п.). Для таких исследований необходимы максимально подробные данные о трехмерной структуре тех макромолекул, которые являются основной мишенью для препарата. В настоящее время имеется банк таких данных (см. приложение 2), включающих значительное число рецепторов ферментов и нуклеиновых кислот. Прогрессу в этом направлении способствовал ряд факторов. Прежде всего был усовершенствован рентгеноструктурный анализ, а также разработана спектроскопия, основанная на ядерно-магнитном резонансе. Последний метод открыл принципиально новые возможности, так как он позволил устанавливать трехмерную структуру веществ в растворе, т. е. в некристаллическом состоянии. Существенным моментом явилось и то, что с помощью генной инженерии удалось получить достаточное количество субстратов для подробного химического и физико-химического исследования.

Важнейший аспект физико-химической фармакологии заключается в том, что наряду с приборными (инструментальными) физическими методами все большее место в ней занимает *компьютерное моделирование*.

Первоначально (около тридцати лет назад) термин «компьютерное моделирование» чаще всего соответствовал понятию численного (осуществляемого на ЭВМ) эксперимента [565]. Однако в то время уже были широко распространены квантовохимические расчеты и некоторые другие громоздкие вычислительные задачи. Постепенно граница между расчетами такого типа и собственно компьютерными экспериментами стала размываться. Действительно, и в том, и в другом случае при правильной постановке исследования расчет приводит к получению новой информации, причем вычисления отнюдь не сводятся к обработке результатов экспериментальных измерений.

В настоящее время компьютерное моделирование как метод исследования находит широкое применение. Применительно к весьма разнообразным разделам естествознания (и даже не только естествознания) к области компьютерного моделирования можно отнести следующие задачи [566]:

1. Расчетное воссоздание (восстановление, построение) какой-либо системы и/или ее свойств.

2. Расчетное воспроизведение какого-либо процесса (компьютерный эксперимент).

3. Выявление и описание функциональных зависимостей (корреляций).

Это моделирование, потому что всегда используется некоторая модель (приближение). Оно компьютерное, поскольку требуется значительный объем вычислений.

Если теперь обратиться к физико-химической фармакологии, то конкретное содержание перечисленных задач можно представить следующим образом:

1. Расчеты строения и спектров молекул и других атомно-молекулярных систем на основе квантовой химии и теоретической молекулярной спектроскопии.

2. Построение потенциальных поверхностей.

3. Установление корреляции «структура—активность» на основе молекулярной динамики.

Примечательно, что компьютерное моделирование почти неизбежно, почти всегда придает описанию рассматриваемой системы структурный оттенок, либо описание оказывается полностью структурным. Это закономерно: структурные представления все шире и глубже внедряются в химию, новейшие достижения химиков очень часто связаны с изучением именно структурных аспектов явлений. Многочисленные примеры такого рода можно найти в биохимии и смыкающейся с ней молекулярной биологии (функционирование белков и полинуклеотидов, иммунологические реакции).

Отметим, что само понятие «*структура*» временами используется неточно и даже вообще не по существу. В действительности структура — это сложное многоуровневое понятие, существующее в форме ряда весьма различных приближений, и нужно им пользоваться так, чтобы в каждом конкретном случае была ясна сущность и степень достоверности подразумеваемой модели.

В работе [566] приводится определение структуры. *«Структура — это всегда модель, это всегда некое приближение. Стоит отметить, что если в английском языке для понятия «приближение» есть два термина: approach и approximation, то в русском для этого существует лишь одно слово — «приближение», но от этого оно не теряет своих двух смыслов: все равно оно остается, с одной стороны, приближением в смысле approach и с другой — приближением в смысле approximation. Структура есть приближение в обоих значениях этого слова».*

Чаще всего и подробнее всего рассматривается структура молекул и кристаллов, но чрезвычайно важна для химии и структура других конденсированных фаз, а также прочих образований, которые не являются молекулами (например, ассоциатов и кластеров).

Используя имеющиеся данные о свойствах многих биологических макромолекул, удастся с помощью компьютеров моделировать и их структуру. Это дает четкое представление о геометрии не только всей молекулы, но и ее активных центров, взаимодействующих с лигандами. Исследуются особенности топографии поверхности субстрата, характер его структурных элементов и возможные виды межатомного взаимодействия с эндогенными веществами или ксенобиотиками. С другой стороны, компьютерное моделирование молекул, использование графических систем и соответствующих статистических методов позволяет составить достаточно полное представление о трехмерной структуре фармакологических веществ и распределении их электронных полей. Такая суммарная информация о физиологически активных веществах и биологических мишенях их действия (рецепторы, ферменты, гены, переносчики) должна способствовать эффективному конструированию потенциальных лигандов с высокими комплементарностью и аффинитетом.

12.1.1. ПРОГНОЗИРОВАНИЕ БИО-ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВЕЩЕСТВ

В комплексных сравнительных исследованиях с целью поиска потенциальных лекарственных средств для количественной их оценки обычно используются следующие характеристики системы «организм—лекарство»:

- 1) сродство лиганда к рецептору, характеризующееся равновесными константами процессов распада рецепторно-лигандных комплексов [537];
- 2) дозы, вызывающие развитие полумаксимальных физиологических (фармакологические и токсикологические) эффектов [540];
- 3) внутренняя активность соединений [539];
- 4) абсолютная и относительная биологическая доступность, среднее время удерживания [567].

Каким бы научным и аппаратным потенциалом не обладала лаборатория, она не в силах провести соответствующие исследования даже для сравнительно небольших рядов химических структур. Если, например, взять количество гексапептидов, которые могут быть синтезированы из 20 природных аминокислот, то их число соответствует 20^6 (64 млн.). Следовательно, всегда перед исследователем стоит одна задача: из всего теоретического массива необходимо выбрать небольшое количество веществ, потенциально обладающих наибольшим сродством к определенному рецептору или ферменту. Более того, такие соединения должны соответствовать заданным фармакокинетическим параметрам. С этой целью используют различные методические приемы, но все они имеют одну цель — прогнозирование кандидатов в лекарства.

Наиболее распространенным для прогнозирования био-физико-химических свойств веществ является метод *комбинаторного анализа*. Его составными частями служат хемоинформатика и компьютерное моделирование (computer aided drug design: CADD).

Следовательно, становится возможным, используя базу данных о соответствующих веществах, комбинируя их строение с помощью компьютерной техники осуществлять дизайн кандидатов в лекарственные средства.

Становление и развитие *хемоинформатики* определило своей целью превращение многочисленных разрозненных данных в информацию, а ее — в знания для достижения быстрого и оптимального конструирования лекарств [568].

Хемоинформатика в некоторых случаях используется в качестве термина, заменяющего понятие *биоинформатики*. Однако это не верно, так как биоинформатика относится к уже устоявшейся дисциплине, дающей сведения о структуре генетического кода, используя последовательность нуклеотидов (А—Г—Ц—Т), кодирующих расположение в белке 20 аминокислот [569]. Так как хемоинформатика оперирует большим числом химических веществ (структура, включая стереохимию и свойствами), то биоинформатика может считаться только частным случаем хемоинформатики.

В целом хемоинформатика — это ни что иное, как соответствующие базы данных, получившие название *больших библиотек* (larger libraries). Все они условно могут быть разделены на две группы:

1. Массивы, содержащие информацию о веществах, которые могут быть отнесены к лекарственным (*drug—like*). Обеспечивает эту информацию World Drug Index.

2. Массивы, содержащие информацию о веществах, которые не могут быть использованы, как лекарственные (*non-drug—like*), разработчик Available Chemical Database.

В настоящее время функционирует значительное количество больших библиотек веществ первого типа, но все они построены практически по одному плану [570, 571] и включают следующие показатели:

- регистрация вещества;
- химическая структура, степень очистки, спектральные характеристики;

- биологическая активность;
- взаимосвязь структура—активность (SAR/QSAR);
- физико-химические свойства;
- виртуальный скрининг;
- база данных соответствия виртуальный—реальный скрининги;
- статистические методы;
- визуализация.

Анализ каждой из перечисленных позиций свидетельствует о том, что идеальной ситуацией считают ту, при которой в базе данных имеются не только перечисленные вещества или их энантиомеры, но и сведения о методах синтеза (компьютерный или реальный), спектральные характеристики и чистота. Они вводятся в регистр до или в течение регистрации соединения. Также решающим показателем, без которого не имеет смысла регистрация, является профиль биологического действия вещества.

Среди методов QSAR, включающихся в хемоинформационные массивы, наиболее часто используется так называемый сравнительный анализ молекулярных полей, то есть CoMFA. Особенно успешным этот метод является тогда, когда неизвестна конформация мишени (рецептора) и ее можно предположить исходя из структуры лиганда, определяемой по фармакологическому ответу или параметрам связывания [572].

Учитывая важность такого показателя как биодоступность, зависящего от физико-химических свойств вещества, к хеометрическим показателям отнесена их *липофильность* [573]. В этом случае используются либо $\log P$, либо $\Delta \log D$.

Виртуальная скрининговая база данных библиотек обязательно включает двух- (2D) и трехмерные (3D) дескрипторы различных групп веществ, способствующих в гомологичных рядах дать определенную характеристику активному центру рецептора. Используя данные методы становится возможным предсказывать, а в последствии и проверить формакофорную группу лиганда [574]. Следует отметить, что виртуальный скрининг на основе моделирования QSAR (2D) или (3D) является решающим

в определении кандидатов в препараты. К недостаткам относится тот факт, что не все биологические мишени (протеины) достаточно изучены и представлены в соответствующих библиотеках.

К статистическим методам относятся *основной компонентный анализ PSA* (principal component analysis) или факторный анализ, использующийся для сокращения количества молекулярных дескрипторов (молекулярная масса, липофильность, количество доноров и акцепторов протонов).

Визуализацией достигается улучшение восприятия материала (графики, схемы), полученного в процессе CADD. Существует множество программ, облегчающих в этом плане задачи исследователей [575]. Наиболее успешными являются WIMP (Windows icons, mouse and point-and-click) и IVR (Immersive virtual reality).

Основная задача комбинаторного анализа — сокращение числа претендентов на звание кандидата в препараты. Используя данные хемоинформатики этого можно достичь двумя путями: 1) провести поиск в библиотеке; 2) виртуально сконструировать, а затем проверить в соответствующей базе данных. В обоих случаях предполагается поиск надлежащей химической структуры. С целью облегчения поиска надлежащих веществ и ускорения виртуального скрининга в настоящее время большие библиотеки формируются по принципу *строительных блоков ВВ* (building blocks), выполняющих функцию отдельных баз данных.

Отличительная черта больших библиотек от ВВ заключается в следующем. Во-первых, незначительное число веществ в ВВ может быть охарактеризовано более тщательно на основании ряда новых методов, недоступных для большого массива соединений. Это позволяет получать более надежные результаты. Во-вторых, меньшее число структур облегчает комбинаторные процессы. В-третьих, интерпретация и использование QSAR становятся более управляемыми, так как появляется возможность использования желаемых показателей, описывающих свойства молекул [576]. В этом случае оптимальная селекция веществ, удовлетворяющая запросы исследователя в области молекулярного дизайна лекарств должна включать три

составных части: 1) разнообразие; 2) наиболее полный охват свойств; 3) отсутствие лишних характеристик.

12.1.2. ОПИСАНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ВЕЩЕСТВ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Существуют простые расчетные методы, описывающие определенные зависимости структура—активность веществ (SAR/QSAR) и сложные компьютерные модели. Однако в обоих случаях для успешного функционирования этих систем необходимыми являются: формализованные описания химической структуры и биологической активности; наличие базы данных химических соединений, о которых достоверно известно, обладают ли они или не обладают данной активностью (обучающей выборки); наличие математического аппарата, позволяющего проводить сравнение химических структур и вырабатывать решающие правила для последующего прогнозирования активности.

Основная гипотеза, на которой основываются все работы по анализу связи структура—активность, состоит в том, что, исходя из сходства химической структуры веществ, можно предполагать проявление ими близких фармакологических эффектов. Если мы имеем дело с химическим соединением, которое не было синтезировано специально с целью получения определенной биологической активности, то можно тем не менее по наличию в его структуре определенных фрагментов (*дескрипторов*) предполагать, что данное вещество при воздействии на аналогичные системы будет проявлять вполне конкретные фармакологические эффекты [577]. Наоборот, если даже мы заранее предполагаем наличие некоторого основного действия вещества, то в этом случае можно попытаться предсказать вероятные побочные эффекты по его химической структуре. Такой подход весьма напоминает обычные рассуждения фармакологов и химиков и, несмотря на очевидную его ограниченность широко

используется на практике при разработке новых лекарственных средств.

Все используемые разновидности молекулярных дескрипторов можно отнести к трем типам:

1. *Интегральные* — отражают особенности структуры молекул, как целого (липофильность, молярная рефракция, параметры структурного подобия, квантовохимические характеристики и др.);

2. *Локальные* — отражают особенности структуры отдельных фрагментов молекул (константы заместителей и физикохимические характеристики отдельных групп, заряды на атомах, их поляризуемость);

3. *Полевые* — отражают особенности воздействия молекулы на окружающее пространство (потенциал электростатического поля, поля липофильности и др.).

В настоящее время рынок компьютерных программ для молекулярного дизайна биологически активных веществ насыщен всевозможными программными продуктами. Анализ состояния проблемы представлен в обзорной статье [578]. Автор обращает внимание на следующее программное обеспечение:

1. MOLSURF, обеспечивающее дескрипторами QSAR. В ней молекулы описаны не квантово-химическими (HOMO, LUMO), а химическими терминами (водородные связи, электрофилы, нуклеофилы, кислоты, основания, липофильность). Программа отдает предпочтение дескрипторам заместителей, поскольку они в отличие от молекулярных дескрипторов, более точно отражают изменение свойств при модификации структуры.

2. Расчет с использованием теоретических дескрипторов в рамках концепции линейных соотношений свободной энергии. Для количественной оценки стерических взаимодействий используют значение молекулярных ван-дер-ваальсовых объемов (V_{mc}). При расчете водородной связи выделяют две составляющие — кислотную и основную.

3. Наиболее распространенной компьютерной программой, с помощью которой проводятся расчеты энергий межмолекулярных

взаимодействий и используются дескрипторы для установления взаимосвязи структура—свойство, является программа CoMFA (Comparative molecular field analysis) — метод сравнительного анализа молекулярных полей.

В его основе лежат следующие предпосылки:

- на молекулярном уровне, взаимодействия, вызывающие наблюдаемый биологический эффект, обычно являются нековалентными;

- силовые поля молекулярной механики, в большинстве из которых нековалентные взаимодействия рассматриваются только с помощью стерических (ван-дер-ваальсовых) и электростатических сил, могут с большой точностью учесть огромное множество наблюдаемых молекулярных свойств.

В связи с этим, основными характерными чертами CoMFA являются:

- представление молекул лигандов через их стерические и электростатические поля, рассчитываемые в дискретных точках трехмерной решетки;

- техника «подгонки поля» («Field Fit»), делающая возможной взаимное выравнивание молекул, входящих в изучаемую серию, минимизацией полевых отличий;

- анализ данных методом частичных наименьших квадратов (PLS-методом), важной чертой которого является способность анализировать большое число дескрипторов.

Однако программа CoMFA не лишена некоторых недостатков. Прежде всего необходимо отметить, что она до последнего времени не рассчитывала значения энергий водородных связей, играющих определяющую роль во многих биологических процессах. Кроме того, практически невозможно на основе параметров, выступающих в качестве независимых переменных в конечном регрессионном уравнении, построить какую-либо содержательную физическую модель взаимосвязи структура—свойство, поскольку эти переменные представляют линейную комбинацию многих тысяч дескрипторов.

4. Определенное сходство с CoMFA имеет программа GRID. В ней также используются различные по природе атомы и функциональные группировки в качестве пробных атомов для оценки межмолекулярных взаимодействии с исследуемыми макромолекулами, «помещенными» в трехмерную решетку. Существенно, что данная программа, в отличие от CoMFA, учитывает не только стерические и электростатические взаимодействия, но и водородные связи.

5. В качестве альтернативы применения упомянутых выше программ CoMFA и GRID можно рассматривать подходы, использующие отображение пространственной структуры и способность к межмолекулярным взаимодействиям в виде спектра межатомных расстояний или межатомных взаимодействий. В этих случаях молекулярная структура представляется в форме кривой радиального рассеяния, которая легко может быть найдена для молекулы любой сложности, если известны ее декартовы координаты.

Отметим, что всеобъемлющее описание молекулярной структуры с помощью какого-либо одного дескриптора практически невозможно. Один дескриптор может учесть преимущественно одну особенность электронной или пространственной структуры, либо один вид межмолекулярных взаимодействий. По этой причине описание молекулярной структуры несколькими дескрипторами и построение моделей структура-свойство, основанных на нескольких независимых переменных, представляется разумным.

При создании моделей структура—биологическая активность большое значение в отборе дескрипторов имеют современные представления о процессах в организме, происходящих с участием химических веществ. Например, стадии ADME лучше всего описываются с использованием таких дескрипторов как реакционная способность и их способность к комплексообразованию.

Биологический ответ (R) характеризуется взаимодействием исходного вещества или его продуктов с соответствующими мишенями, обуславливающими конкретный вид фармакологической

активности. На этом этапе большое значение имеет трехмерная структура взаимодействующих партнеров.

При создании моделей необходимо соблюдение и формальных критериев. С точки зрения статистики число рассматриваемых соединений должно во много раз превышать число дескрипторов. При этом дескрипторы должны быть достаточно информативными и в то же время между ними не должно быть взаимной корреляции. Достигается это различными процедурами, включая экспериментальный дизайн, метод SIMCA/PLS, главном компонентный и факторный анализы [578].

При анализе взаимосвязи структура-активность кроме дескрипторов структуры используются дескрипторы, описывающие биологическую активность. Несмотря на то, что биологическая активность является одним из наиболее важных свойств химических соединений, это понятие не имеет строго определения. Это может быть процесс «биологического узнавания», т. е. специфического связывания низкомолекулярных веществ (лекарств) с высокомолекулярными (рецепторы, ферменты, ионные каналы и др.), массопереноса веществ (ADME/PK), биологического ответа (R, ADME/t).

12.1.3. ОТНЕСЕНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ К ПОТЕНЦИАЛЬНО ЛЕКАРСТВЕННЫМ

Количество теоретически возможных биологически активных соединений может составлять 20^{40} . Поэтому первая задача, стоящая перед исследователем — отобрать определенную группу веществ для всестороннего изучения. Значительные сложности могут возникнуть при использовании новых рядов химических веществ. Хотя среди них в последствии могут быть найдены вещества с необычными свойствами.

Какие критерии существуют в хемоинформатике, которые используются для отнесения вещества к потенциально

лекарственным? В основном это простые показатели, относящиеся к физико-химическим свойствам соединений (молекулярная масса, $\log P$ и количество групп, образующих водородные связи). Все они, со значительной степенью достоверности, коррелируют с биодоступностью. Это явление послужило основой установления «правила пяти» [579], которое гласит, что к потенциально лекарственным веществам, следует относить те, у которых молекулярная масса ≤ 500 , $\log P \leq 5$, количество групп-доноров протонов ≤ 5 и количество групп-акцепторов протонов ≤ 10 .

Правило было выведено, после анализа взаимосвязи этих показателей с биодоступностью, сотрудниками фирмы «Пфайзер», с использованием 2245 препаратов, полученных из каталога World Drug Index. Предполагается, что такая зависимость характерна только для препаратов, транспортирующихся в клетке с помощью специфических переносчиков (раздел 6.3.3).

Расчетные данные физико-химических свойств 6304 веществ, находящихся в базе данных Comprehensive Chemistry Database [580] позволили ранжировать большинство из них (80 %) соответственно процессу биодоступности (табл. 12.1).

Таблица 12.1

Расчетные показатели, обеспечивающие биологическую доступность веществ

Физико-химические свойства	Минимальные значения	Максимальные значения
$\log P$	— 0,4	5,6
Молярная рефракция	40	130
Молекулярная масса	160	480
Тяжелые атомы металла	20	70

Как и в предыдущем случае, в этих исследованиях прогнозированию подвергались вещества, имеющие различное строение. В хемоинформационных базах данных существуют физико-химические показатели определенных рядов химических

соединений (гомологов), отличающихся друг от друга лишь заместителями. В этом случае можно проследить роль заместителя в проявлении био-физико-химических свойств. Известно, что ряд заместителей играют значительную роль в процессах метаболизма и токсичности базовых соединений. Более того, они очень часто являются источником нестабильности веществ в физиологических условиях.

Благодаря разработанной программе REOS (Rapid Elimination of Swill) удастся отбраковать вещества малопригодные для дальнейшего исследования в качестве лекарственных. Границы таких значений представлены в таблице 12.2.

Таблица 12.2

Предполагаемые границы значений физико-химических свойств соединений, обеспечивающих их надлежащую биодоступность [581]

Физико-химические свойства	Минимальные значения	Максимальные значения
Число заместителей доноров протонов	0	5
Число заместителей акцепторов протонов	0	10
Формальный заряд	−2	+2
Число вращающихся связей	0	8
Молекулярная масса	200	500
Log <i>P</i>	−2	5

В таблице 12.2 представлены результаты исследований с использованием REOS — анализа, построенного на основании семи баз данных. Первая из них, включала 5120 соединений. Остальные — от 10 000 до 100 000 веществ.

В настоящее время установлены [580] функциональные группы, наличие которых в лекарственных средствах — нежелательно (табл. 12.3).

Используя выборку соединений (3500), с установленными био-физико-химическими свойствами была создана [580] программа, с помощью которой представляется возможным

Таблица 12.3

**Функциональные группы, препятствующие отнесению веществ
к лекарственным**

альдегиды	изотиоцианат
α -галогенаты	кетон (> 2)
α - β -ненасыщенные (> 2)	нитрон (> 2)
амиды (> 2)	оксим
арил-Br	P=S-связь
арил-Cl (> 3)	гидроксил в ароматическом ядре (> 2)
арил-F (> 3)	фосфин
арил-I (> 3)	эфир фосфорной кислоты
азид	фосфор (> 1)
азо-соединения	первичный спирт (> 2)
карбаматы (> 3)	первичный амин (> 2)
карбамоилхлорид	первичный ароматический амин (> 1)
карбонат	вторичный спирт (> 2)
эфир карбоновых кислот (> 2)	вторичный амин (> 2)
ангидрид карбоновых кислот	кремний
остаток карбоксильной кислоты (> 2)	S—N-связь
краун-эфиры	сульфоны (> 1)
соль диазония	сульфонамид (> 2)
дисульфид	сера (> 3)
дитиокарбамат	эфир серной кислоты
двойная связь (> 2)	четвертичный алифатический амин (> 2)
эпоксид	четвертичный ароматический амин (> 2)
гидразин (> 1)	тиоэфир (> 1)
имины (> 1)	тиомочевина (> 2)

прогнозировать потенциальные лекарственные средства (СМС) и не относящиеся к таковым (АСД). Процент достоверности в первом случае составляет 80 %, а во втором — 70 %. Это сложная программа, основанная на принципе ветвления (рис. 12.1).

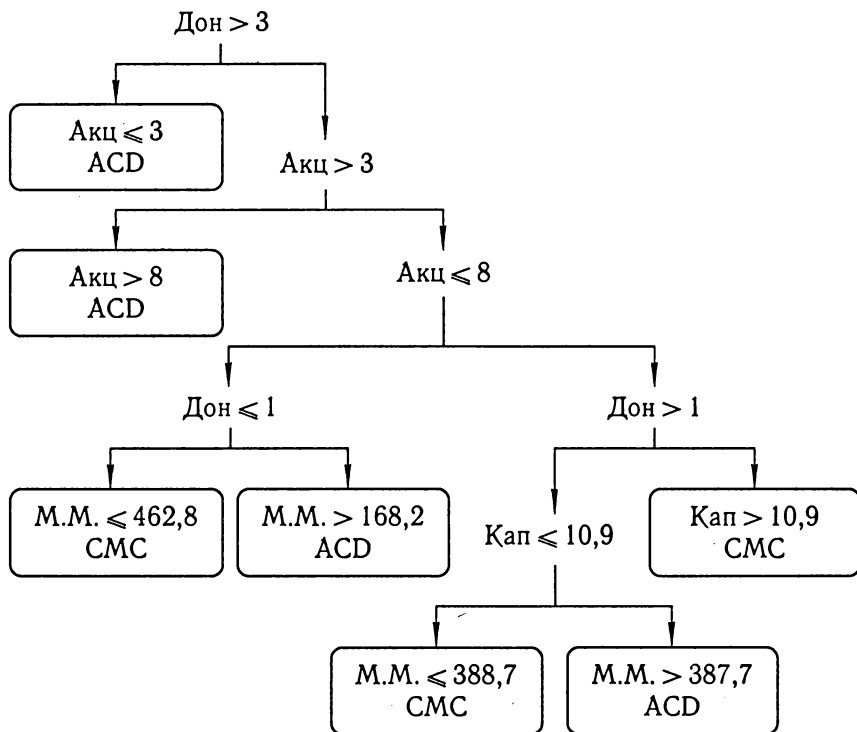


Рис. 12.1. Дескрипторы, разделяющие вещества на лекарственные (СМС) и нелекарственные (ACD)

Согласно заключению авторов если молекулярная масса (М.М) соединений составляет $\leq 388,7$, кап 10,924, количество групп доноров протонов > 1 , а акцепторов > 8 или акцепторов ≤ 8 , а доноров ≤ 3 , то этот класс веществ можно относить к потенциально лекарственным.

Еще раз подчеркнем тот факт, что все представленные нами программы в качестве биологической активности использовали показатель «узнавания» молекулы мишени (транспортера), что в конечном счете характеризует трансформные участки молекул веществ.

Белки плазмы крови (сывороточный альбумин и α -1-кислый гликопротеин (АГП)) также относятся к белкам переносчикам

лекарств (раздел 6.3.3.5), поэтому являются объектом пристального внимания исследователей в области прогнозирования взаимосвязи протеин—лиганд. Работа с такими макромолекулами, например, человеческим сывороточным альбумином, является весьма сложной, поскольку этот белок имеет шесть центров связывания низкомолекулярных соединений. Однако получение альбумина в кристаллическом виде и установление его структуры облегчает эту задачу.

В исследованиях [581] механизмов взаимодействия сывороточный альбумин—лекарство традиции нарушены не были и одним из показателей физико-химических свойств последних был использован $\log P$. На примере как ксенобиотиков, так и большого числа лекарственных средств установлена следующая закономерность:

$$\text{Log } 1/C = 0,67 \log P + 2,6 \quad (n = 25, r^2 = 0,89, s = 0,24).$$

Последующие исследования были проведены с использованием констант ассоциации (K_A) при связывании цефалоспоринов с человеческим сывороточным альбумином и K_W^I -способностью хроматографического удерживания:

$$\text{Log } K_A = 3,91 \log K_W^I - 13,01 \log K_W^I + 13,68.$$

Для производных арилпропионовой кислоты эта закономерность [582] имеет следующий вид:

$$\text{Log } n_1 K_1 = 0,83 \log K_W^I + 0,18,$$

$$\text{Log } n_2 K_2 = 1,05 \log K_W^I - 1,68.$$

В этом случае n — число, связывающих участков на альбумине, с соответствующими константами ассоциации K_1 и K_2 .

Если в качестве макромолекулы используется АГП, то при взаимодействии с антигистаминными препаратами наблюдается следующая корреляция:

$$\text{Log } K_{\text{АГП}}^I = 0,942 + 1,045 \log K_{\text{АМ}}^I + 1,625 N_{ch} - 0,013 S_r,$$

где $K_{\text{АГП}}^I$ — константа ассоциации лекарства с АГП;

K_{IAM}^I — способность удерживаться на хроматографической колонке;

N_{ch} — заряд на азоте алифатической цепи и

S_{r} — объем раствора.

Разработана и успешно используется более сложная модель, с помощью которой имеется возможность прогнозировать интенсивность процесса связывания лекарств и сывороточного альбумина человека [583]. В качестве обучающей системы была использована база данных экспериментального материала по связыванию 95 различных препаратов (β -адреноэргические антагонисты, стероиды, трициклические антидепрессанты).

Наиболее информативными дескрипторами для прогноза процесса связывания оказались следующие показатели: $C \log P$ (–1,87; 7,48), топологический индекс (0; 0,33), частичный заряд на атомах (0; 0,67), дипольные моменты (0,66; 8,89), число групп доноров протонов (0; 7). В скобках приведены границы показателей, обеспечивающих максимальную эффективность связывания альбумином препаратов.

В отличие от белков-транспортёров белки-катализаторы требуют несколько иного подхода при изучении связывания ими лекарств (субстратов). В большинстве случаев в качестве обучающей выборки используют каталитические свойства СУР450, вносящего наибольший вклад в процессы метаболизма препаратов (раздел 8.1).

Благодаря рентгеноструктурному анализу, а также технике гомологического моделирования [584] определено строение А-, В-, F- и J-субъединиц фермента и трехмерное расположение его активного центра. Такая информация позволяет прогнозировать субстратные и ингибиторные свойства исследуемых соединений. В отличие от показателей, использующихся для прогноза биодоступности биологически активных веществ, а отсюда и отнесении их к таковым, определение аналогичных показателей для метаболических процессов (т. е. установление метабоформных групп) является более сложным. В этом

случае наряду с показателем $\log P$ необходимо учитывать размер и поверхность соответствующей молекулы, а также наличие определенных групп, атакуемых ферментами [585].

Наиболее часто используется квантово-механическое моделирование, объясняющее состояние образовавшегося комплекса при взаимодействии CYP450 с лекарствами [586]. С помощью данного метода не только описана взаимосвязь между строением лекарств и их способностью к трансформации в монооксигеназном катализе, но и объяснены механизмы региоселективности действия ферментов [586].

Наличие соответствующих баз данных и программ позволяет прогнозировать не только направление биотрансформации молекулы препарата, но и предвидеть структуру метаболитов, имеющих электрофильные центры. Отсюда становится возможным предсказать процессы их взаимодействия с макромолекулами клетки, а также возникновение цитотоксичности (раздел 10.2).

К наиболее распространенным программам, с помощью которых представляется возможность прогнозировать $ADME/t$ (токсичность) относятся следующие [587]:

1. Техника распознавания образов. В ее основе лежит прогноз токсичности, базирующийся на данных структуры веществ. Например, программа MULTICASE, использует методы сравнительного анализа структурных элементов молекул с аналогичными фрагментами веществ с известной токсичностью. Используя так называемые статистически взвешенные величины можно прогнозировать токсическое действие веществ. К этой группе относятся также программы CASE, TOPKAT и ADAPT [588].

2. Система, учитывающая свойства веществ (DEREK, HAZAR-EXPERT). С помощью этих программ можно вычленить молекулярные фрагменты, с которыми соединение приобретает риск возникновения токсичности. Полученные этими методами данные могут быть использованы в других программах, в которых осуществляется дизайн и скрининг биологически активных веществ.

Существуют базы данных, располагающих информацией о конкретном виде токсичности, например, мутагенности [588]. В одной из них (CCRIS) можно прогнозировать мутагенную активность веществ, которая в опытах *in vitro* соответствует *тесту Эймса* (как с активацией, так и без активации тестируемого соединения).

Для каждого вещества, которое поступает для обработки, в этой программе заложены данные, образующие два класса дескрипторов. Во-первых — топологические индексы и общие свойства молекул, с которыми работают операторы. Во-вторых, обязательно используется информация, которая содержится в других источниках. Например, в программах MDL и MOLSKEYS, содержащих информацию о разнообразии и подобии веществ. Различные виды токсичности и их прогнозирование представлены в сети Интернет (TOXNET, <http://toxnet-nim.nih.gov>).

Последовательность процессов компьютерного моделирования ADME представлена на рисунке 12.2 [589].

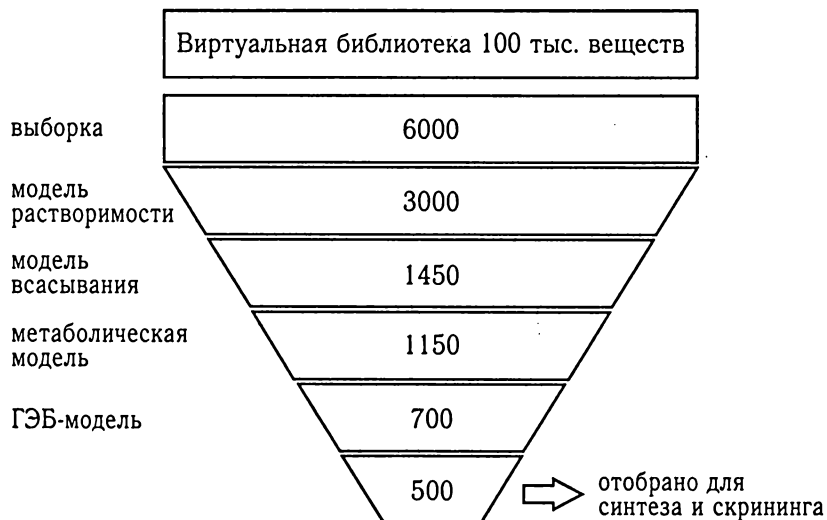


Рис. 12.2. Использование компьютерных моделей ADME для селекции веществ методом последовательной выбраковки

12.1.4. ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ДЕСКРИПТОРОВ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Ранее указывалось (раздел 12.1.3), что невозможно описать зависимость структура—активность с помощью одного дескриптора. Тем не менее, существуют дескрипторы (липофильность, способность соединений к образованию водородных связей, молекулярная масса), наиболее часто встречающиеся в такого рода исследованиях.

Наиболее распространенная группа дескрипторов межмолекулярных взаимодействий для анализа структура—активность связана с липофильностью ($\lg P$, $\lg D$, раздел 2.1.3). В большинстве случаев оценку липофильности осуществляют экспериментальными методами [579].

Расчет липофильности может проводиться по различным схемам [590, 591], включая аддитивность вкладов липофильных констант атомов: PROLOGP (Broto), MOLCAD (Chose Crippen), CHEMICALC 2 (Suzuki); фрагментов: PROLOGP (Original Rekker), SYBYL (Reversed Rekker), CLOGP (Leo Hansch), CLOGP (Klopman), KOWWIN (Meylan Howard); использование молекулярных дескрипторов: BLOGP (Bodor), SciLog p (Bodor), ASCLOGP (Van DE Waterbeemd), HINT (Abraham Vellog).

На процесс распределения соединений в системе органический растворитель—вода влияют в основном два фактора — объем молекул и их способность к образованию водородных связей. Поэтому для количественного описания вклада молекулярного объема в липофильность могут быть использованы [578] такие дескрипторы, как молекулярная масса, молекулярный объем, молекулярная поверхность, интеграл спектров ван-дер-ваальсовых взаимодействий, молекулярная рефракция и молекулярная поляризуемость.

Анализ большинства компьютерных программ, предназначенных для расчета $\lg P$ показал, что точность расчета липофильности простых нейтральных органических соединений

удовлетворительная, а сложных соединений, особенно лекарств, содержащих многие функциональные группы, — весьма невысокая. Это можно объяснить тем, что в большинстве расчетов используется не точная аддитивная схема вкладов коэффициентов распределения соединений в системе октанол—вода, а аддитивность логарифмов вкладов атомов и фрагментов. Кроме того, опубликовано мало результатов экспериментальных определений липофильности соединений, содержащих несколько катионных и/или анионных групп. В то же время именно такие данные должны составлять основу для точных расчетов липофильности сложных ионизированных соединений.

В последние годы для характеристики липофильности наряду с приведенными выше «классическими» дескрипторами широко используется такой дескриптор, как *молекулярный потенциал липофильности* (Molecular Lipophilicity Potential, MLP), количественно описывающий липофильность в трехмерном пространстве.

Водородная связь имеет определяющее значение в образовании многих молекулярных и ионных комплексов LADMER. Более того, для количественного описания вклада водородной связи в липофильность использованы значения факторов доноров (C_d) и акцепторов (C_a) свободной энергии водородной связи.

В настоящее время на смену учета межмолекулярных взаимодействий на уровне индикаторной переменной началось развитие эмпирических шкал водородной связи на основе экспериментальных значений термодинамических параметров. Существует два подхода количественного описания, особенности соединений к образованию водородных связей: *аддитивно-мультипликатный* и *мультипликатный*.

Развитие и успешное применение приведенных выше эмпирических подходов возможно лишь при расширении базы экспериментальных данных по термодинамике водородной связи. Детальное описание обширной базы таких данных представлено в статье [592]. Для расчета значений C_d и C_a были отобраны 414 доноров водородной связи и 1298 акцепторов, для которых

имелись экспериментальные термодинамические параметры взаимодействия с несколькими партнерами. Составленная матрица содержала 414 столбцов и 1298 строк. Это позволило провести строгий расчет значений C_a и C_d .

Важно подчеркнуть, что интервалы значений факторов свободной энергии водородной связи для различных функциональных групп перекрываются. Это свидетельствует о том, что заместители при донорном или акцепторном атоме играют исключительно важную роль в формировании способности этих атомов к образованию водородной связи [578, 593].

В заключение отметим, что детализация количественного описания межмолекулярных взаимодействий возможна при использовании разностей энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS), связанных с ΔG соотношением (Глава 1):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S.$$

Значения ΔG , K , ΔH и ΔS для какого-либо процесса можно рассматривать в качестве дескрипторов межмолекулярных взаимодействий. Так, при моделировании взаимосвязи структура—активность в качестве дескриптора достаточно часто используются константы диссоциации кислот и оснований (раздел 2.1.2).

Значительная группа дескрипторов межмолекулярных взаимодействий, оцениваемая из экспериментальных данных по реакционной способности, состоит из различных констант, описывающих электронное влияние заместителей на реакционную способность химических соединений. Основы этого направления были заложены Гамметом, установившим значения параметра σ (*константа Гаммета*) на основе соотношения:

$$\text{Log } K_x = P_\sigma + \text{log } K_H,$$

где K_x — соответствующая константа для *мета*- (σ_m) или *пара*-замещенной (σ_p) бензойной кислоты;

K_H — константа ионизации для бензойной кислоты в воде при 25°C.

К настоящему времени предложено ряд автоматизированных систем, позволяющих быстро и надежно устанавливать значения pK_a , сконструированных, но еще не синтезированных соединений. К таким программам относятся ACD и SPAR [581].

12.1.5. ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВ

Нетрудно заметить, что независимо от строения веществ для их надлежащих свойств в процессах ADME и особенно биодоступности необходимы идентичные показатели (например, правило пяти).

В связи с тем, что различные по структуре вещества обладают различными фармако-терапевтическими свойствами, а последние обусловлены многообразием биологических мишеней, с которыми они образуют комплексы, построение компьютерных моделей не может быть сведено к какому-то одному типу. Поэтому разработаны различные компьютерные модели, описывающие взаимосвязь структура-активность (SAR/QSAR). Все они являются частью так называемого *виртуального скрининга* биологически активных веществ или метода исследований *in silico* (в компьютере).

В начале пути методы виртуального скрининга использовали в качестве дескрипторов биологические свойства молекул. Например, в системе PASS [577] использовались специализированные выборки (антиамнестической, противоязвенной активности и др.).

В настоящее время приоритет отдается моделированию структур биологических мишеней, что дает четкое представление о геометрии не только всей молекулы, но и ее активных центров, взаимодействующих с лекарствами. Отсюда возможность

получить информацию о трехмерной структуре биологически активного вещества.

Следовательно, наиболее перспективными являются подходы, основанные на моделировании биологических мишеней действия лекарств, так как в данном случае возможен не только прогноз биологической активности, но и формирование гипотезы о механизме действия.

В основе моделирования рецепторов лежат основополагающие воззрения Эмиля Фишера, объясняющие явления, происходящие на поверхности клеток, где по его мнению расположены определенные, стратегически важные группировки в местах (сайтах) связывания. Они специфически связывают низкомолекулярные лиганды (лекарственные средства). При связывании агониста (раздел 10.1) образуется рецепторно-лигандный комплекс, при этом изменяется конформация рецептора. Оно, в свою очередь, инициирует определенный внутриклеточный механизм передачи «сигнала» своей клетке, целью которого является многократное усиление исходного «сигнала» от рецептора и, в результате, получение специфического ответа (открытие ионных каналов, фосфорилирование ферментов и др.). Такое взаимодействие сопровождается понижением свободной энергии системы «лиганд—рецептор» (Глава 1).

Энтальпийная составляющая и эффект связывания описываются межмолекулярными взаимодействиями (водородными связями, электростатическими взаимодействиями и контактами гидрофобных остатков).

В рецепторе участки взаимодействия с лигандом носят название центров активности, а соответствующие им участки лигандов называют эффектофорными (фармакофорными) группами (фармакофорами).

В рамках виртуального скрининга *фармакофором принято считать необходимое пространственное расположение молекулярных фрагментов, обеспечивающих структуру и физико-химические свойства, которые в свою очередь определяют биологическую активность вещества.* Таким образом, фармакофор

это совокупность признаков молекулы и его можно идентифицировать, дать характеристику, но невозможно изолировать.

Понятием фармакофор оперируют во всех случаях при изучении взаимосвязи структура—активность соединения.

Среди методов моделирования рецепторов выделяют две группы:

1) методы, использующие напрямую данные строения рецептора;

2) не прямые методы, в которых оценка комплементарности лигандов к рецептору заменены определением сходства лигандов между собой.

12.1.5.1. ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ ИЗВЕСТНОЙ СТРУКТУРЕ РЕЦЕПТОРА

Точное знание топографии рецептора позволяет применить разнообразные методы конструирования биологически активных веществ. Все они основаны на оценке параметров, отражающих энергию взаимодействия лиганд—рецептор. Построение в последующем уравнений QSAR способствует дальнейшему прогрессу конструирования лекарств.

Суть его сводится к обычным комбинаторным приемам, т. е. использование различных фрагментов органических молекул, что позволяет [594]:

— выбирать случайные из них и помещать в любое незанятое место на поверхности рецептора;

— смещать фрагменты на поверхности в любом направлении, на любое расстояние со случайными поворотами;

— случайно менять атомы и группы во фрагментах на другие;

— присоединять случайно взятые из набора фрагменты к уже размещенным на рецепторе;

— соединять воедино размещенные фрагменты мостиками из любых выбранных.

Оценка энергии взаимодействия и минимизация конформационной энергии создаваемых фрагментов, дает возможность конструировать необходимую молекулу.

Существенным ограничением этого метода является то, что пространственная структура рецептора бывает не всегда известна. В этом случае рекомендуется определять набор точек в пространстве (псевдорецептор) на основе конформационного анализа изучаемых соединений.

Метод моделирования псевдорецептора основан на использовании дескрипторов межмолекулярных взаимодействий [595]. После стандартной процедуры пространственного «выравнивания» структур, конструируемой серии для каждой из них генерируется три типа векторов:

1) вектор донора водородной связи (HEV_s). Конечная его точка соответствует идеальному положению для акцепторной группы рецептора.

2) вектор неподеленной электронной пары (LPV_s). Конечная его точка соответствует идеальному положению для донора водородной связи.

3) вектор гидрофобного связывания (HPV_s). Его началом является неполярный водород, конечная точка — гидрофобная часть рецептора.

Посредством кластеризации в пространстве с шагом 1—3 Å определяются точки наибольшей плотности указанных типов векторов.

В область расположения этих точек последовательно вносятся остатки (шаблоны) рецепторов, наиболее часто участвующих в связывании лигандов. Для этого, как правило, используется специальная база данных [595]. Подбор шаблонов производится из расчета потенциала липофильности.

В дальнейшем моделируется реальная среда в рецепторе, для чего комплекс «лиганд—псевдорецептор» сольватируется, т. е.

погружается в молекулы воды и окружается гидрофобным сольвентом (виртуальная жидкость Леннард—Джонса).

На последнем этапе расчетов для каждой молекулы оценивается энергия взаимодействия с псевдорецептором, значение которого дает возможность вычислить свободную энергию связывания лиганда с псевдорецептором. Качество модели проверяется сравнением рассчитанных и экспериментальных показателей.

12.1.5.2. КОСВЕННЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ КОМПЛЕМЕНТАРНОСТИ ЛИГАНДОВ РЕЦЕПТОРУ

Такие подходы основаны на предположении о том, что наиболее активные молекулы лучше соответствуют полости и активным центрам рецептора. Следовательно получив трехмерное изображение структуры молекулы биологически активного вещества и выполнив их оптимальное совмещение (выравнивание, суперпозицию) можно получить относительную модель рецептора. Неактивные молекулы используются в качестве информативных о индифферентных областях рецептора. Характеристики сформированной таким образом молекулы используются в дальнейшем для описания связи структура—биологическая активность. Лиганды, подвергаемые непрямому 3D QSAR анализу должны быть близки по размерам и форме, поскольку лишь в этом случае возможно однозначное конструирование молекулы.

В данном случае, собственно как и в большинстве аналогичных ситуаций, для оценки биологической активности веществ по их физическим, химическим и физико-химическим показателям применяются методы QSAR, основанные на поиске статистической зависимости (корреляции) между этими показателями.

Фактически при поиске такой корреляции используется регрессионный анализ. Получаемые при этом уравнения,

связывающие структурные показатели с биологической активностью, обычно называют корреляционными или регрессионными уравнениями типа структура—активность [596].

Связь между структурными показателями и биологической активностью веществ может быть определена либо чисто эмпирическим подбором показателей, исходя из общих соображений, либо на основе модельных представлений.

Примером модельного подхода в сочетании с эмпирическим может служить классический метод, разработанный Ханчем [597]. Базовыми показателями в такой системе QSAR являются липофильность и электронные свойства веществ, а также их активность, такая взаимосвязь описывается следующим уравнением:

$$\text{Log } BR = f(r, r_2, r_3, \dots),$$

где BR — биологический ответ (IC_{50} , ED_{50} , LD_{50} , K_i и др.), а r_n — молекулярные дескрипторы.

Следовательно, в модели Ханча используются представления о линейной зависимости свободной энергии изучаемого процесса от физико-химических параметров соединений, которые считаются независимыми переменными.

Наряду с этой моделью существуют и другие. Например, в аддитивной модели Фри—Вилсона биологическая активность представляется как сумма активности типового соединения в гомологическом ряду и активностей заместителей. Принимается предположение о равном вкладе заместителя в одном и том же положении независимо от того с каким соединением в ряду он связан. Критические замечания по этому поводу известны [598].

Напомним, что структура химического соединения может быть представлена в виде структурной химической формулы, в виде электронной структуры, характеризуемой определенным набором квантово-химических индексов и, наконец, в виде трехмерной структуры (3D).

Одной из трудностей в использовании 3D QSAR методов является проблема внутреннего движения нежестких молекул (проблема конформационной лабильности). Это обусловлено тем, что в ходе взаимодействия с рецептором, молекула лиганда приобретает конформацию, не соответствующую ее глобальному минимуму энергии. Поэтому, в случае отсутствия экспериментальной информации о такой конформации молекулы, следует пользоваться дополнительными приемами:

1. использование конформации с глобальным минимумом энергии;
2. поиск пространственно подобных молекул в базах данных;
3. генерирование большого числа стерически допустимых конформаций для каждого вещества.

Как правило, их отличие в энергии от глобального минимума составляет $\Delta E = 5-6$ ккал/моль [599]. Такая разница в энергии может быть скомпенсирована при взаимодействии молекулы с активным сайтом биофазы действия. Дальнейший анализ полученных конформаций связан с предположением о том, что анализируемые параметры имеют положительную корреляцию с проявляемой активностью «активных» конформаций молекул.

4. Подгонка конформации (варьирование торсионных углов) соединения под некий шаблон. Им может быть наиболее жесткая из активных структур рассматриваемой серии, т. к. ее конформация изначально является «активной».

Первым шагом при построении большинства моделей 3D QSAR является оптимальное совмещение структур исследуемой серии. Автоматизация такого совмещения обычно проводится минимизацией некоторой функции, отражающей структурное подобие совмещаемых молекул.

Структурное подобие зависит от координат атомов. В этом случае возможно совмещение по атомам, входящим в состав фармакофорных групп или по атомам, лежащим в основе жесткого каркаса молекулы, а также по всем атомам молекулы [600].

Структурное подобие зависит также от распределения различных физико-химических свойств в молекулах. Такая процедура чаще всего применяется для молекул, отличающихся по своему строению. В таких случаях молекула помещается в пространственную решетку размером 0,4—1,0 Å. Для каждой точки решетки, рассчитываются физико-химические параметры, являющиеся существенными для проявления биологической активности. Процедура совмещения сводится к минимизации отличий в ячейках решеток.

Часто используемым приемом при анализе связи структура—свойство, является метод расположения молекул в главных осях инерции [601].

Один из наиболее популярных методов 3D QSAR—CoMFA (раздел 12.1.2). В методе CoMFA каждая молекула из исследуемой выборки помещается в пространственную кубическую решетку. Затем в каждый узел решетки помещается пробный атом, «щуп» для оценки стерического и электростатического взаимодействий. Атом щуп менял свойства Sp^3 — углеродного атома и заряд + 1,0. Значения стерического отталкивания, превышающие 30 ккал/моль, отсекаются. Для электростатического взаимодействия применимо то же правило, с той лишь разницей, что отсекаемые значения могут быть положительными и отрицательными.

Правило выравнивания, расположение молекулярных моделей внутри зафиксированной решетки, является наиболее важной настроечной характеристикой метода CoMFA, поскольку рассчитываемые энергии взаимодействия сильно зависят от относительного расположения молекул. При операции «подгонка поля» минимизируются различия в сумме стерических и электростатических энергий. Если используется серия конформационно жестких молекул «Правило выравнивания» заменяется оптимальным совмещением жестких фрагментов структур молекул с молекулой-шаблоном [594].

Несмотря на свои большие возможности метод CoMFA имеет ряд недостатков:

1) метод в его стандартной форме не учитывает энтропийный фактор взаимодействия лиганд—рецептор;

2) метод не учитывает возможность образования водородных связей между молекулами лиганда и рецептора;

3) потенциал Леннард—Джонса, учитывающий стерическую составляющую суммарной энергии взаимодействия, весьма чувствителен к изменению расстояния в точках вблизи атомов молекулы, что вынуждает использовать значение 30 ккал/моль в качестве граничного;

4) контурные карты, используемые для интерпретации результатов CoMFA иногда имеют ряд разрывов и отражают только участки, находящиеся вне молекулы.

С помощью метода CoMSIA (Comparative molecular similarity analysis) — метод сравнительного анализа индексов подобия сделана попытка [602] преодолеть некоторые недостатки CoMFA. Обычно подобие оценивается с помощью следующих физико-химических свойств: атомного радиуса, атомного заряда, $\log P$, C_d и C_a . В качестве статистического метода (как и в CoMFA) используется PLS-метод.

Использование математического аппарата позволяет избежать недостатков метода CoMFA, обусловленных наличием отсекаемых значений. Кроме того, строящиеся в рамках метода контурные карты легче интерпретируются по сравнению с картами, полученными методом CoMFA.

Рецепторно-лигандное взаимодействие положено в основу еще двух методов QSAR [603]. Особенность первого, так называемого «докинг» метода, заключается в установлении трехмерной структуры рецепторно-лигандного комплекса, который может быть сформирован как с лабильными, так и с жесткими молекулами биологически активных веществ. В зависимости от используемых дескрипторов для «докинг» метода разработаны различные программы: DOCK, Flex, FLOG, GOLD, PRO SELECT [604].

Ко второму методу относятся программы SPROUT, LUDI, PRO LIGAND, LEGEND, CONCEPTS, MCSS, HOOK, SPLICE

и др., использующие *индикаторные* (de novo константы) дескрипторы. Они кодируют в неявном виде различные структурные особенности соединений (свойства C_a и C_d , наличие или отсутствие водородной связи внутри молекул, *орто*-эффекты, *цис*-, *транс*- или стереоизомерию), поэтому отнести их к какому-либо одному классу трудно.

Индикаторные дескрипторы особенно полезны [578] на ранних стадиях исследований. С их помощью могут формироваться комбинации различных подвыборок веществ с рассматриваемой активностью для получения обучающей выборки, предназначенной для QSAR.

В совокупности различные способы определения связи структура—активность образуют один из важнейших методологических подходов для выявления закономерностей LADMER, которые в большинстве случаев осуществляются с применением компьютерной техники и соответствующего математического обеспечения.

12.1.6. ИСКУССТВЕННЫЕ НЕЙРОННЫЕ СЕТИ

Биологические элементарные нейронные сети служат для усиления слабых сигналов, уменьшения слишком интенсивной активности, выделения контрастов, поддержания ритмов или сохранения рабочего состояния нейронов путем регулировки их входов. Искусственные нейронные сети — это интегральные электронные цепи со стандартными элементами, которые выполняют наиболее часто повторяющиеся операции и могут быть включены в схемы самых разнообразных электронных приборов в том числе и компьютеров.

Нейронные сети, часто также называемые искусственными нейронными сетями (ANN) или вычислительными нейронными сетями, представляют собой упрощенную математическую модель обработки информации головным мозгом человека.

Тем не менее большинство современных архитектур нейронных сетей не воспроизводит в точности функции мозга, и их следует рассматривать как разновидность параллельных алгоритмов [605].

Искусственные нейронные сети становятся одним из наиболее широко применяемых методов построения разнообразных количественных зависимостей. Благодаря возможности построения нелинейных моделей любого уровня сложности методология искусственных нейронных сетей нашла широкое применение в рамках QSAR.

Среди известных архитектур нейросетей ведущее место по популярности занимает многослойная нейросеть прямого распространения, обучающаяся по методу обратного распространения ошибки. В ней имеется возможность обобщать и аппроксимировать данные с высокой точностью.

Нейронные сети состоят из набора нескольких слоев простых, но соединенных между собой большим количеством связей вычислительных элементов, называемых — *нейродами* (в нервной системе — *нейрон*). Каждый нейрод имеет различные входы (x_1, x_2, \dots), а связь между отдельными двумя нейродами характеризуется действительным числом, называемым *весом связи* (рис. 12.3).

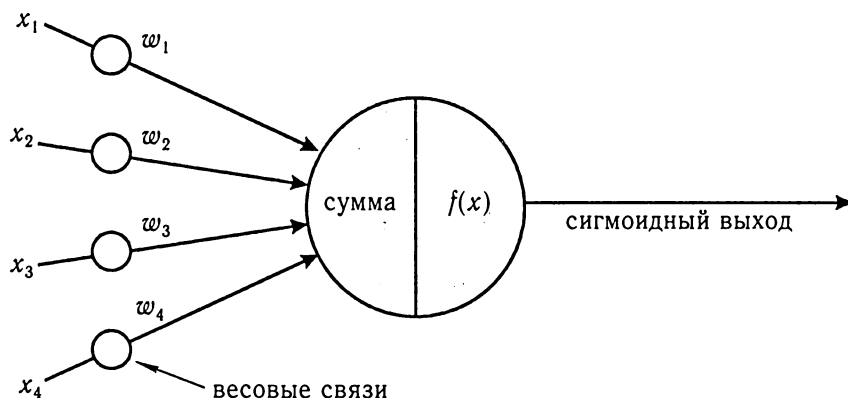


Рис. 12.3. Искусственная нейронная сеть

Совокупность весовых коэффициентов связей между нейронами определяет вычислительные свойства нейросети, и ее обучение сводится к соответствующей настройке весовых коэффициентов.

Внутри каждого нейрона выполняются двустадийные вычисления. Сначала вычисляется общий выходной сигнал Net нейрона путем суммирования всех w , а затем с помощью передаточной функции вычисляется выходной сигнал Out этого нейрона. В качестве передаточных чаще всего применяются сигмоидные функции [606], как показано на рисунке 12.4.

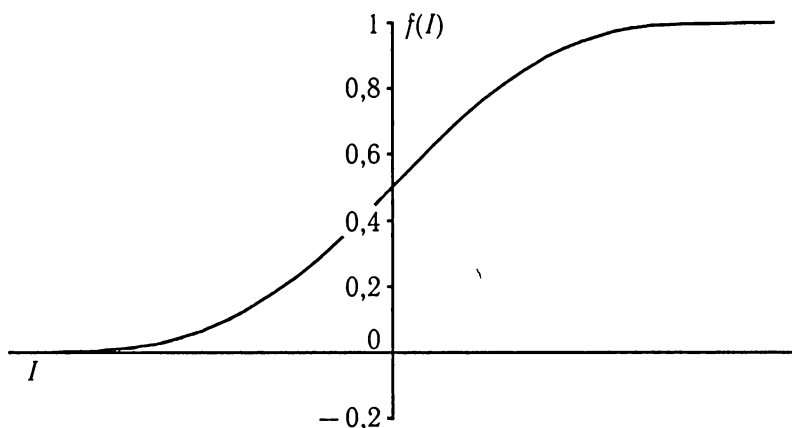


Рис. 12.4. Типичная сигмоидная передаточная функция, где $I = \sum w_i x_i$

Архитектура нейронной сети определяется топологией соединения нейронов между собой. Для моделирования QSAR применяют нейросети, состоящие из нескольких слоев, число которых диктуется конкретной архитектурой нейросети [607].

Слои обычно подразделяют на три группы: входной, скрытый и выходной (рис. 12.5).

Для всех нейронов, принадлежащих одному слою, характерно одинаковое число входных связей, соединяющих нейрон с предыдущим слоем. Рассчитанными выходными значениями всей нейросети являются выходные сигналы последнего вычислительного слоя сети.

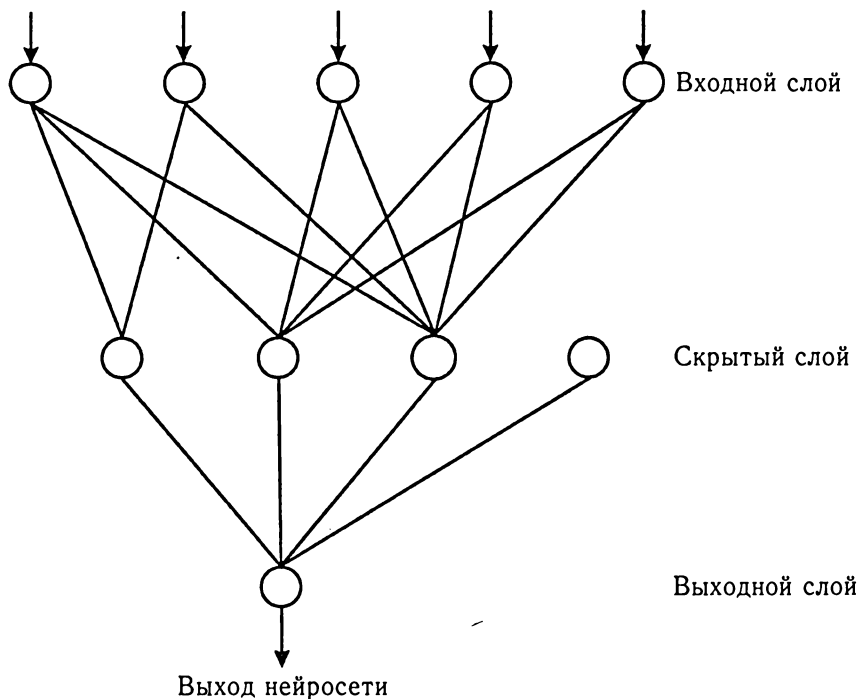


Рис. 12.5. Структура нейросети прямого распространения
(→ различные дескрипторы)

Нейросети прямого распространения характеризуются послойной передачей сигнала от входа нейросети к ее выходу. Они могут содержать несколько скрытых слоев (рис. 12.5) или состоять только из входного и выходного слоев.

При обучении многослойных нейросетей прямого распространения настройка проводится последовательно, начиная со связей выходного слоя. Поэтому методы обучения таких нейросетей носят название методов обратного распространения ошибки [608]. Для каждого слоя нейросети обучение выполняется по правилу Уидроу—Хоффа или дельта-правилу. При обучении по методу гибкого распространения (RPROP) для подстройки весовых коэффициентов используется только информация о знаках частных производных функции ошибки нейросети

(обычно сумма квадратов ошибок на выходных нейронах). Квазиньютоновские методы обучения (BFGS) базируются на ньютоновском методе аппроксимации функций. На каждой итерации вычисляется вектор, компоненты которого равны частным производным ошибки нейросети по всем весовым коэффициентам.

Как и в предыдущих случаях (разделы 12.1.1—12.1.5) при нейросетевом моделировании QSAR для описания структур соединений используют соответствующие дескрипторы. При этом выбирают только те, которые вносят существенный вклад в активность. Такой выбор можно производить предварительно или в ходе обучения нейросети.

Предварительный отбор параметров осуществляется с применением пошагового множественного регрессионного анализа [609] или с помощью нейросетевых алгоритмов [610].

Примером нейросетевых алгоритмов может быть соответствующая сеть, использующая «генетический» алгоритм обучения. Это своего рода стохастический метод оптимизации, в основе которого лежат эволюционные принципы. Из разнообразных вариантов описания объектов на протяжении нескольких поколений выбирают те, которые включают в себя наиболее значимые параметры. В литературе описаны разнообразные методы генерирования нового поколения в рамках «генетического» алгоритма. Это так называемый *метод аппроксимации генетической функции* [611] и *эволюционное программирование* [612].

Совокупность параметров, подаваемых на вход нейросети, как правило, представляют в виде вектора. Поэтому при выборе описания необходимо выполнить следующие условия [613]: 1) количество и тип используемых дескрипторов одинаковы для всех описываемых структур; 2) каждому дескриптору соответствует определенная компонента в векторе параметров; 3) различным молекулам соответствуют различные вектора параметров.

Для того, чтобы осуществить анализ полученных нейросетевых зависимостей, необходимо вычислить значения частных производных исследуемых свойств последовательно по значениям всех исходных дескрипторов на множестве примеров

из обучающей выборки. Таким способом вычисляется набор статистических функций, позволяющий оценить вклад всех исходных дескрипторов в построение нейросетевой модели.

Для оценки нейросетевых моделей используют стандартные статистические функции: вычисляют среднеквадратические ошибки, коэффициенты корреляции или распознавания.

Во многих случаях, для того чтобы сделать выводы об адекватности использования нейросетевого моделирования, сравнивают модели нейросетевых алгоритмов, с моделями, полученными другими методами (PLS, CoMFA).

Несмотря на ограниченность анализа полученных нейросетевых зависимостей, все же в ряде работ приведены результаты успешного количественного нейросетевого моделирования сродства веществ к различным рецепторам [614], транспортным белкам [615], моделирования констант ингибирования ферментов и ряда биологических активностей.

12.2. ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫЕ СКРИНИНГОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Теоретический (виртуальный) поиск вещества с определенными свойствами заканчивается получением информации об искомом средстве, например, структурная формула соединения или фармакофора, за созданием которых следует синтез и дальнейшее испытание его свойств. Химический синтез и биологический скрининг веществ довольно сложные, трудоемкие, а потому и дорогостоящие этапы изучения лекарственных средств. Поэтому во многих развитых странах в последнее время широкое распространение получили высокопродуктивные скрининговые технологии (*High-Throughput Screening, HTS*).

Особенности данной технологии следующие: 1) использование незначительного количества соединения; 2) создание больших коллекций веществ (100 тыс. — 1 млн.) с однотипным

действием; 3) автоматизация процессов и высокая скорость (10^4 — 10^5 анализов за один день).

12.2.1. ADME/ПК — СКРИНИНГОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Наиболее узким местом фармакокинетического (ADME/ПК) анализа является точное определение содержания препарата в соответствующих частях организма экспериментальных животных. Ошибка, которая возникает на этом этапе перечеркивает все дальнейшие размышления экспериментатора, даже в случае использования им лучшей математической обработки полученных результатов.

Точное и быстрое определение концентрации лекарств в плазме крови всегда было сдерживающим фактором развития HTS в этой отрасли. Что касается аналитических методов, которые были созданы для качественного и количественного определения одного препарата или группы родственных соединений, например 1,4-бенздиазепинов, то наиболее успешно применяемым в экспериментальной фармакологии является радиоизотопный метод [93, 616]. Однако, он относится к трудоемким и затратным, поскольку требует наличия меченого радиоизотопом препарата, синтез которого всегда проблематичен даже в хорошо оснащенных химических лабораториях. Поэтому особое развитие получили в настоящее время различные модификации метода флуоресцентного [617] и хроматографического [618] анализов.

Рассматривая пути усовершенствования хроматографических методов анализа лекарств и их метаболитов в биологических жидкостях, следует отметить, что они касаются практически всех пяти этапов [591]:

1) введение соответствующей дозы препарата и получение (изолирование) биологического материала, содержащего образец;

- 2) калибровка аналитического метода;
- 3) подготовка образцов для анализа;
- 4) количественный анализ;
- 5) обработка информации и заключение.

Благодаря созданию новых хроматографических приборов и усовершенствованию подготовки образцов началось развитие высокопродуктивных технологий. С целью более точного измерения препаратов и их метаболитов в среде, содержащей биологический материал, аналитические методы калибруют, путем добавления известных концентраций испытуемых веществ. Такие образцы, анализируют вещества соответственно протоколу, разработанному для экспериментальной процедуры.

При создании соответствующих технологий наиболее уязвимыми считаются процедуры, направленные на очистку образцов от коэкстрактивных веществ биологического происхождения. Они необходимы для того, чтобы свести к минимуму возможность загрязнения аналитической аппаратуры и надежной идентификации метаболитов.

При хроматографическом анализе используют в большей степени матричную очистку образца, которая достигается путем экстрагирования соединения на жидкостной или твердой фазах. Сокращение времени и увеличение количества анализов стало возможным благодаря методу прямого (без очистки) введения образцов. В этом случае имеет место взаимодействие лекарства со стационарной фазой с последующим его (вымыванием) растворением и анализом.

Значительный шаг вперед в создании высокопродуктивных технологий был сделан в связи с развитием в конце прошлого века жидкостной хроматографии высокого давления (HPLC) в комбинации с ультрафиолетовым детектором или масс-спектрометром (MS). Параллельно были начаты работы по конструированию и использованию робототехники в серийном анализе. Составлены специальные программы, дающие роботам возможность выполнять несложные физические операции на отдельных этапах общего анализа [618]. Несмотря на некоторое

увеличение продуктивности труда, возникли другие проблемы, которые ограничивали их использование:

- 1) большинство таких методов были ненадежными и часто требовали ремонта, с последующей калибровкой;
- 2) в лучшем случае, методы были полуавтоматизированными;
- 3) регуляция операций во время работы хроматографа, соединенного с tandemом масс-спектрометров (LC-MS/MS) уменьшала интенсивность выполнения анализов.

Наиболее удачными оказались биоаналитические системы, которые были созданы на базе платформ с соответствующими форматами микротитровальной платы. Более того, замена в форматах пробирок и трубок на соответствующие платы сделала возможным использование автоматических технологий [619].

В настоящее время внедрены новые подходы, в которых используются LC/MS с твердофазными экстракционными формами с 96-ячеистыми платами. На подготовку 96 образцов требуется не более двух часов.

Еще большее распространение получили твердофазные экстракционные системы, оборудованные дисковыми технологиями [620]. Для них специально уменьшена плотность адсорбирующего слоя, что делает возможным элюцию образца в объеме необходимом для непосредственного хроматографического анализа.

Последние модели биоаналитических приборов позволяют экспериментатору без предварительных специальных обработок плазмы крови непосредственно вводить ее в хроматограф. Одна из таких систем [621] состоит из небольших картриджей (внутренним диаметром 10 мм), заполненных особым полимером или кремниевыми частицами. Образцы плазмы вводятся непосредственно в систему, из которой коэкстрактивные вещества удаляются методом элюции. Благодаря неламинарному потоку воздуха в подвижной фазе эндогенные соединения в ней не задерживаются и необходимый образец анализируется в течение 1,5 мин.

Несмотря на то, что биоаналитическая аппаратура все время совершенствуется приходится констатировать тот факт, что человеческий фактор в ее эксплуатации играет значительную роль. Не исключена возможность, что в недалеком будущем фармакокинетические процессы будут изучаться с помощью систем, включающих полностью автоматизированные процедуры, начиная с получения биологического материала, подготовки для качественного и количественного анализов, и его определения.

Значительное внимание при этом должно уделяться системам лабораторно-информационного управления, которые в свою очередь необходимо объединить с необходимыми для оператора хемоинформационными структурами.

Высокая производительность фармакокинетических исследований достигается также с помощью внедрения новых технологий подготовки образцов и экспериментального оборудования. Тем не менее, это не единственный путь, поскольку существует много возможностей увеличить интенсивность проведения анализов манипулируя биообъектами. Как правило, такие подходы рассчитаны на получение одного какого-либо показателя, например всасывания.

Существуют, по крайней мере, два методических подхода, направленных на увеличение количества анализов в серийных опытах определения биодоступности.

Во-первых, различные образцы в идентичных исследованиях могут быть объединены и одновременно введены в организм экспериментальных животных. В этом случае различные химические соединения в идентичных экспериментах представляют собой односерийный образец.

Наиболее успешными в таких случаях зарекомендовали себя так называемые *дозированные кассеты* (cassette dosing). Они были использованы в доклинических исследованиях антагонистов α -адренорецепторов [622]. Кассеты содержали от 5 до 30 образцов биологически активных веществ сходной структуры. Одновременно в кассету помещался образец — сравнение

(стандарт) с хорошо изученными показателями биодоступности. Его необходимость диктуется возможным взаимодействием отдельных веществ, составляющих кассету, между собой. Введение кассет возможно пероральным и внутривенным путем. Обработка плазмы крови животных является общепринятой процедурой, а анализ осуществляется сочетанием методов LC-MS/MS.

В опытах по изучению антагонистов GP IIb/IIIa рецепторов были использованы кассеты, содержащие 40 и более образцов. Аналогичный методический прием был успешно применен в изучении взаимосвязи структура веществ—фармакокинетические свойства [623].

Метод имеет и своих критиков, сомневающих в реальности полученных результатов, так как они считают что в экспериментах *in vivo* в случае дозированных кассет не удастся избежать взаимодействия «вещество—вещество».

К другим вариантам массового скрининга биодоступности соединений относится метод, в котором объединяются плазмы крови нескольких животных, содержащие определенное вещество. В этом случае взаимодействие «вещество—вещество» в плазме животных отсутствует, поскольку одно животное получает одно вещество. Все остальные компоненты AUC (Глава 6) сохранены. Представленный метод дает возможность анализировать до 200 соединений различного терапевтического направления одновременно. Он с успехом используется при экспериментальном определении биоэквивалентности.

Биофармацевтический контроль высвобождения субстанции с лекарственной формы (Глава 5) и фармакокинетический анализ у людей (добровольцев) стал возможным благодаря инженерному искусству конструирования специальных капсул. С их помощью оператор имеет возможность одновременно определить месторасположение капсулы в желудочно-кишечном тракте и концентрацию освободившейся субстанции, а также время за которое осуществляется этот процесс. Детально большинство капсульных систем, которые используются

в биофармацевтических и фармакокинетических исследованиях представлено в обзорной статье [624]. Исходя из ее содержания, можно заключить, что большинство таких капсульных систем построены по одному принципу и отличаются одна от другой конструкцией системы дистанционного измерительного прибора:

- *высокочастотная* капсула (Battele-Institute V, Frankfurt-am-Main);

- *гастроцелевая* телеметрическая капсула (bastrotarget, Tonawanda);

- *телеметрическая* капсула (INSERM V61, Strasbourg Cedex);

- *Intelisite* (Innovative Devices).

Каждый из представленных методов имеет свои преимущества, но им свойственны и недостатки. Несмотря на то, что большинство из перечисленных капсул могут быть использованы повторно, а в некоторых случаях и несколько раз к высокопродуктивным их отнести нельзя.

К инвазийным методам определения процессов всасывания лекарств *in vitro* относятся:

- вывернутые и канюлированные мешочки;

- кишечные сегменты;

- мукозные полоски;

- изолированные энтероциты;

- мембранные везикулы.

Эти методы являются основой в опытах по выяснению механизма всасывания.

В последнее время особый размах приобрели опыты с применением культуры тканей. Особенно широко используются *монослойные клетки* Сасо-2, источником которых служат аденокарцинома человека или Мадин-Дарби клеток почек собак (MDCK). Считается, что более прогностическим методом, в случае перенесения данных биодоступности, полученных в эксперименте на животных, на организм человека служат Сасо-2 клетки. В тоже время, MDCK культивируются значительно

удобнее и им характернее большая скорость деления. Поэтому они используются для массового скрининга биодоступности веществ.

В целом, в основу определения биодоступности на культурах тканей положено понятие РаРР (величина, отвечающая скорости, с которой исследуемое вещество перемещается с апикальной к базальной части монослоя). Значение РаРР, и соответствующие показатели, полученные в экспериментах на целостном организме в большинстве случаев совпадают. В то же время, наблюдаются и некоторые расхождения. Однако, если сравнению подлежат величины биодоступности различных соединений в аналогичных условиях, т. е. в массовом скрининге, то такие результаты правомочны, поскольку — относительны.

12.2.2. ФАРМАКОГЕНОМИКА И БИОИНФОРМАТИКА

Одной из самых больших научных побед биологов считается расшифровка нуклеотидной последовательности ДНК генома человека. Решена часть глобальной проблемы изучения структуры и функций носителей наследственности. Полученные результаты, в рамках этой проблемы, приближают нас к раскрытию механизмов реализации генетической информации, являющейся необходимым условием для дальнейшего управления биологическими процессами. В результате появилась новая наука — геномика, объект которой — совокупность всей наследственной информации организма, т. е. его геном.

Ранее количество генов в геноме человека оценивали в 60—80 тысяч. По последним данным, их меньше — 25—35 тысяч (табл. 12.4). Большинство из них «молчит». Постоянно в клетках работают гены, кодирующие белки (2 %), РНК (20 %), а более 50 % составляют повторяющиеся последовательности, которые трудно клонируются и поэтому дают много пробелов.

Таблица 12.4

Предполагаемые молекулярные функции 26 383 генов человека

Белок	Количество	Процент
<i>Ферменты</i>		
Гидролазы	163	0,5
Изомеразы	56	0,2
Лигазы	117	0,4
Синтазы и синтетазы	656	2,1
Трансферазы	313	1,0
<i>Преобразователи биологических сигналов</i>		
Избирательные регуляторные молекулы	988	3,2
Киназы	868	2,8
Рецепторы	1543	5,0
Сигнальные молекулы	376	1,2
<i>Белки репликации ДНК</i>		
Ферменты	2308	7,5
Фактор транскрипции	1850	6,0
<i>Другие белки</i>		
Транспортеры/переносчики	203	0,7
Вирусные белки	100	0,3
Смешанные	1318	4,3
Белки клеточной адгезии	577	1,9
Шапероны	159	0,5
Структурные белки цитоскелета	876	2,8
Белки внутриклеточного матрикса	437	1,4
Иммуноглобулины	264	0,9
Ионные каналы	406	1,3
Сократительные белки	376	1,2
Структурные мышечные белки	296	1,0
Протоонкогены	902	2,9
Белки, избирательно связывающие кальций	34	0,1
Внутриклеточные переносчики	350	1,1
Переносчики	533	1,7
<i>Белки с неизвестной функцией</i>	12 809	41,7

Важным достижением при расшифровке генома человека было установление количества генов, кодирующих белки. На момент объявления о практическом завершении генома ученые группы «Геном человека» рассчитали 32 000 белок-кодирующих генов, а группа Celera Genomics — около 40 000, что оказалось намного меньше чем прогнозировалось ранее (до 150 млн.).

Столь большое различие можно объяснить следующим образом. Во-первых, полная расшифровка не завершена и многие вопросы идентификации генов еще предстоит решать. Во-вторых, не исключено, что в организме человека каким-то образом экономно используется минимальное количество генов для кодирования большого количества белков.

Имеющиеся данные позволяют охарактеризовать типичный ген человека. Он состоит примерно из 28 000 оснований и включает в себя восемь экзонов. Кодирующая последовательность такого гена имеет 1300 п. н. и несет информацию о белке, состоящем из 450 аминокислотных остатков. Самый большой из обнаруженных генов человека — ген дистрофина ($2,4 \cdot 10^6$ п. н.).

Структура генов человека намного сложнее, чем у других эукариот: часто они прерываются большими интронами, примерно 35 % генов могут считываться с разными рамками, 40 % иРНК могут подвергаться альтернативному сплайсингу. Следовательно, одна последовательность ДНК может кодировать более чем один тип иРНК. С этой проблемой связано еще одно новое направление в генетике — *протеомика* (протеин-белок), изучающее полный набор белков организма.

Расшифровка первичной структуры белков на основе установленных белок-кодирующих генов еще не указывает на раскрытие функций тех или иных продуктов генов. За этим следует длительный систематический анализ протеома человека. Большое значение в установлении роли определенных белок-синтезирующих генов имеет сравнение первичной структуры белков с известными и неизвестными функциями, которые получены от представителей видов различного уровня эволюционного развития. На основе установления только первичной

структуры белка нельзя говорить о точной его функции. Тем не менее, изучение генома дает важную информацию о возникновении белковых доменов, о семействах самих белков (раздел 3.1).

Секвенирование генома послужило толчком к исследованию генов, ответственных за болезни человека. Требуется проведение функциональной классификации самих генов и их продуктов — белков. Все гены (923), вызывающие моногенные заболевания или повышающие вероятность возникновения болезни, характеризовались по функции их продуктов в отношении патологического процесса и клинических проявлений. Наибольшую функциональную группу составили ферменты (31 %). Вторая по величине группа — группа белков-активаторов и стабилизаторов, белков, участвующих в правильном сворачивании полипептидных цепей (14 %). Каждая из остальных групп (рецепторы, факторы транскрипции, трансмембранные переносчики и др.) составляли менее 10 % всех генов, вызывающих болезни. Корреляционный анализ между функцией продуктов генных болезней и возрастом больных показал, что болезни, связанные с нарушением функции ферментов, проявляются на всех этапах развития. В то же время болезни, связанные с генами, кодирующими транскрипционные факторы, проявляются на этапе внутриутробного развития.

В последнее время геномика стала объектом пристального внимания и фармакологов. Определено, что процессы взаимодействия низкомолекулярных лекарственных средств с геном отражает новое направление геномики — фармакогеномику. Ее границы в настоящее время не очень широки и включают, практически, один процесс доступный для изучения — дифференциальную генную экспрессию (ДГЭ), имеющую место в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, в условиях влияния лекарственного средства.

12.2.2.1. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ

Большинство генов эукариот, в отличие от генов прокариот имеют прерывистую структуру. Относительно короткие кодирующие участки (экзоны) чередуются с некодирующими участками (интроны). Регуляторные элементы гена — промоторы, определяющие точность инициации, транскрипции, локализованы перед первым экзоном на 5'-конце нити ДНК и представлены несколькими элементами (ТАТА-, ССААТ-боксы, GC-мотив). Экспрессия генов регулируется также усилителями (энхансеры), ослабителями (сайленсоры), а также инсуляторами (ограничители действия энхансеров) и элементами отклика, взаимодействующими с факторами транскрипции, ксенобиотиками, стероидными гормонами и др. Эти последовательности участвуют в определении частоты инициации транскрипции [448, 625].

Первый этап реализации генетической информации — транскрипция. Гены эукариот транскрибируются в виде предшественника, который состоит из экзонов и интронов (незрелая иРНК). Затем интроны вырезаются специальными ферментами, а экзоны последовательно сшиваются друг с другом, формируя готовый для трансляции транскрипт (зрелая иРНК). Этот процесс получил название сплайсинга. Одна и та же последовательность ДНК может кодировать несколько различных белков, благодаря так называемому альтернативному сплайсингу (образование разных иРНК за счет изменения чередования соединения экзонов из одного первичного РНК-транскрипта).

После транскрипции или параллельно с ней незрелая иРНК подвергается дальнейшей модификации. К 5'-концу пре-иРНК с помощью фермента присоединяется метилированный остаток гуанина в 7-м положении пуринового кольца (процесс кэпирования). Считается, что кэп (шапочка) необходима для правильной ориентации и присоединения рибосом к иРНК перед началом трансляции. К 3'-концу пре-иРНК также ферментативно

присоединяется короткая нуклеотидная последовательность, состоящая из остатков аденина (полиаденилирование). Полагают, что поли-А-последовательность необходима для транспорта иРНК через ядерную мембрану в цитоплазму [626].

По выполняемой функции в клетке эукариотические гены делятся на несколько групп.

Первую группу составляют гены, экспрессирующиеся во всех типах клеток. Продукты их деятельности — белки, необходимые для обеспечения жизнедеятельности любой клетки организма (гены рибосомальных РНК, гистонов и др.).

Вторая группа — тканеспецифические гены, которые функционируют только в определенных типах клеток или тканях на определенных стадиях онтогенеза (гены глобулинов, альбумина, α -фетопротеина, иммуноглобулинов, мышечных белков, секреторных белков эндокринных и пищеварительных желез и многие другие).

Третью группу составляют гены, которые кодируют различные белки, участвующие в регуляции транскрипции (транскрипционные факторы). Белковые продукты этих генов взаимодействуют с регуляторными участками генов, вызывая усиление или подавление экспрессии.

К четвертой группе относят гены, экспрессия которых индуцируется внешними факторами, в том числе ксенобиотиками.

Одной из основных задач фармакогеномики является изучение экспрессии генов при различных заболеваниях и воздействии того или иного лекарства или биологически активного соединения. Это позволит определять возможность их направленной регуляции.

Успешное внедрение фармакогеномики в экспериментальную фармакологию стало возможным благодаря развитию соответствующих технологий в том числе и информационных (биоинформатика). Все они ассимилировали и интегрировали фармакогенетику в широкое научное направление.

В целом, все методы ДГЭ состоят из множества, часто повторяющихся одних и тех же операций. Выполнение их вручную малоинтересное занятие. Однако угрозой не является

монотонная работа оператора, а значительно большей проблемой считается бесконечное повторение одних и тех же операций, что может привести к потере точности. Поэтому перед фармакогеномическими технологиями стоит одна задача — частичная или полная автоматизация аналитических операций.

Основой любой технологии является метод, имеющий в аналитической практике свои характеристики (параметры). Для ДГЭ они должны соответствовать следующим требованиям:

- разрешающая способность, связана с определенной точностью определения соседних генов;

- чувствительность — граница n -последовательностей разведения, дающих возможность статистически достоверно регистрировать изменения ДГЭ;

- охват — процент экспрессированных генов данного вида экспериментальных животных или определенной ткани, которые могут быть надежно определены и экспериментально повторяться;

- фальшпозитивная норма — количество генов, ошибочно отнесенных к экспрессированным;

- фальшнегативная норма — количество экспрессированных генов, однако отнесенных к неактивным.

Технологии ДГЭ включают две группы методов. Одна из них, так называемая закрытая, а вторая — открытая архитектурная система [627].

Закрытая архитектурная система требует информацию о каждом гене или клоне и использует в качестве анализатора микрочипы.

Теория создания микрочипов основана на гибридизации олигонуклеотидов известной последовательности, иммобилизованных на твердой поверхности в строго определенных местах, с меченой различными способами пробой. Способствовали созданию данной технологии последние достижения в информатике, химии полупроводников, микроэлектронной промышленности, а также обилие информации, которая накопилась за годы работы над программой «Геном человека».

ДНК-чип — миниатюрная пластина с микроячейками. Каждая микроячейка содержит искусственно синтезированные олигонуклеотиды, соответствующие фрагментам определенных генов, выступающих в качестве матрицы. В этих ячейках происходит комплементарное взаимодействие матрицы и пробы (кДНК исследуемых образцов). В настоящее время существует два направления в создании ДНК-чипов. Они различаются способом синтеза и нанесения матричных олигонуклеотидов [628].

Первое направление основано на предварительном синтезе олигонуклеотидов. Олигонуклеотиды синтезируют химически или с помощью ПЦР (длина от 500 до 5000 оснований) и затем наносят на обработанную специальным образом стеклянную поверхность с помощью роботов. Такие типы чипов получили название кДНК-микрочипов (cDNA-microarray). В ПЦР амплифицируются последовательности кДНК определенных генов. Поэтому данный тип чипов дорогостоящий, так как необходимо создавать собственную кДНК-библиотеку или приобретать ее у крупных исследовательских центров.

кДНК-Микрочипы оказались непригодными для проведения исследований полиморфизма (генетическая изменчивость отдельного локуса в определенной популяции), мутационного анализа, сравнительного изучения экспрессии большого количества генов, так как плотность размещения матричных олигонуклеотидов очень ограничена (число ячеек составляет = 1000 на чип). Кроме того, применение длинных фрагментов ДНК (кДНК) снижает специфичность гибридизации с исследуемой пробой и появляются ложноположительные сигналы, не соответствующие реальной экспрессии генов.

Несмотря на перечисленные недостатки, основное преимущество кДНК-микрочипов — возможность варьирования качественным и количественным составом фрагментов генов.

Более перспективное направление создания чипов — применение фотолитографических технологий [629], которые дают возможность одновременно интегрировать огромное количество

олигонуклеотидов любой последовательности непосредственно на поверхности чипа. Плотность размещения синтезированных таким образом нуклеотидов может достигать 1 млн. на 1 см². Такие чипы, получившие названия ДНК-чипов (DNA-chips), производятся фирмой Affymetrix Inc. Матрица ДНК-чипа — короткая (20—25-мерная) олигонуклеотидная последовательность, причем каждому гену соответствует 15—20 таких олигонуклеотидов, что значительно повышает точность и воспроизводимость результатов. ДНК-чипы позволяют одновременно оценивать экспрессию практически неограниченного количества генов, производить исследование полиморфизма, в том числе и однонуклеотидных замен (SNP). В этом случае синтезируются олигонуклеотиды, специфические для каждой последовательности конкретного гена, учитывая все возможные варианты взаимного расположения нуклеотидов.

При проведении исследований чип гибридизуется с меченой различными способами пробой. При сравнительных исследованиях пробой, как правило, служит кДНК, полученная из контрольного и сравниваемого образцов. В качестве метки используются как радиоактивно меченые молекулы, так и флуоресцентные красители, непосредственно присоединенные к исследуемым образцам. При проведении сравнительного анализа обычно применяют двухцветную детекцию, при которой контрольная и опытная кДНК метятся разными красителями. Результаты регистрируют по интенсивности гибридизационных сигналов тех ячеек чипа, где произошла гибридизация, с последующей компьютерной обработкой данных.

Производятся и упрощенные варианты чипов с небольшим набором генов (в пределах 1000—2000). На нейлоновой мембране фиксируются короткие последовательности известных генов. Они гибридизуются с радиоактивно меченой пробой. Гибридизация детектируется методом радиоавтографии.

Следует отметить, что работа с чипами требует специально дорогостоящего оборудования для проведения гибридизации. Ожидается, что в ближайшие годы цены на комплекты

оборудования для производства чипов и работы с ними будут снижены в связи с насыщением рынка.

Разработка и внедрение в науку и практику новых технологий часто является движущим моментом в развитии медико-биологических отраслей знаний как, например, это было с разработкой в недавнем прошлом технологии ПЦР. Развитие молекулярной биологии в настоящее время многим обязано ПЦР, а теперь и микрочипам. Внедрение технологии микрочипов принципиально и для фармакологии. Разработка новых лекарственных средств уже сейчас начинает основываться на информации о функциональной роли определенных генов в развитии патологии. Поэтому сроки разработок могут сократиться с 10—15 до 5—8 лет [630].

Открытая архитектурная система не требует сведений о структуре гена или клона и делает возможным идентифицировать практически все процессы транскрипции во многих тканях. Более того, эти методы позволяют идентифицировать неизвестные гены, которые экспрессируются в условиях взаимодействия с лекарствами. Чувствительность методов (1:10 — 300 тыс.), широта охвата (60—90 %) колеблется в зависимости от уровня метода и необходимости его использования [631].

Открытая архитектурная система использует следующие методы:

- дифференциальный дисплей [632];
- серийный анализ ДГЭ (SAGE) [633];
- репрезентивный анализ (RDA) [634];
- метод вычитающей гибридизации [635];
- Gene Calling [636];
- общий анализ (TOGA) [637].

Метод дифференциального дисплея был разработан в 1992 году Р. Liang и А. Pardee. Авторы исходили из предположения, что в клетке экспрессируется ≈ 15 тыс. генов. В принципе, на основе каждой индивидуальной молекулы иРНК можно получить фрагмент кодирующей ее ДНК путем обратной транскрипции (кДНК). Затем этот фрагмент можно многократно

воспроизвести методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). При постановки ПЦР авторы использовали необычную пару праймеров. Прямой праймер — короткая последовательность из 10 нуклеотидов произвольного состава — заякоривающий основания (произвольный праймер). Обратный праймер состоял из двух частей. К нескольким остаткам дезокситимина (олиго-dT) присоединяются два дополнительных нуклеотида произвольного содержания. Наличие олиго-dT последовательностей позволяет выделить только поли-А содержащую иРНК. Одновременно она является затравочной молекулой в реакции обратной транскрипции. Прямой праймер позволяет синтезировать большое разнообразие кДНК разной длины. Это связано с тем, что возможность локализации данной последовательности в одном и том же месте в иРНК, транскрибированных с разных генов, крайне мала.

После амплификации набор кДНК разделяют путем электрофореза в полиакриламидном геле и проводят сравнительный анализ различных фрагментов электрофореграмм в опытных и контрольных образцах. Интересующие фрагменты выделяют из геля, определяют путем секвенирования первичную структуру кДНК, проводят компьютерный анализ и с помощью банков данных нуклеотидных последовательностей идентифицируют выявленные гены [621].

Если использовать большое количество прямых произвольных праймеров, варьируя их нуклеотидный состав, и изменять все возможные сочетания двух пар нуклеотидов в Т-якорном праймере, то можно получить информацию о значительном числе транскриптов.

Метод дифференциального дисплея относительно простой в исполнении, не требует больших затрат, средств и времени, позволяет работать с небольшим количеством исходного материала, из-за чего нашел широкое применение в научных исследованиях. Однако этот метод имеет ограничения и недостатки. Во-первых, праймеры, которые применяются в ПЦР, имеют низкую температуру гибридизации с матрицей ($\approx 40^{\circ}\text{C}$),

что снижает специфичность амплификации и ведет к появлению ложно-положительных результатов. На электрофореграмме видно множество избыточных полос, которые не соответствуют реальной дифференциальной экспрессии. Проблема артефактов решается путем модификации структуры праймеров, изменения условий ПЦР, повторяя исследования. Дальнейшему анализу подвергались лишь постоянно проявляющиеся полосы. Во-вторых, при амплификации образуются преимущественно короткие (200—300 п. н.) фрагменты, несущие информацию о 3'-нетранслируемых областях иРНК. Их определение недостаточно для идентификации генов и предсказания их функций. Изменяя условия ПЦР, удалось получить фрагменты кДНК длиной свыше 2 тыс. п. н. Однако самым серьезным недостатком считается невозможность проведения систематического сравнения анализируемых образцов по всем видам иРНК. На основе стандартного метода дифференциального дисплея разработан ряд модификаций, направленных на преодоление ограничений и повышение чувствительности и воспроизводимости методики.

Метод вычитающейся гибридизации используется для поиска последовательности, соответствующей небольшой делеции в геноме. Вычитание — процесс повторяющихся этапов молекулярной гибридизации набора кДНК одного тестируемого (трейсер) образца с избытком кДНК другого сравниваемого (драйвер), контрольного образца. От образовавшихся гибридов отделяют фракцию, которая не участвовала в гибридизации. Она и содержит искомые последовательности.

Основными недостатками первых, получаемых с помощью этого метода обогащенных библиотек, то есть полного набора негибридизовавшейся популяции кДНК, являлась низкая степень представленных искомых последовательностей-мишеней, «неулавливание» редко встречающихся в клетке транскриптов, а также трудоемкость самого метода. В дальнейшем метод прошел ряд усовершенствований, направленных на их устранение.

Метод репрезентативного дифференциального анализа (Representational Difference Analysis — RDA) изначально был

предназначен для поиска различий между двумя сложными геномами. Для обогащения искомыми последовательностями сравнимые геномы упрощались путем деления драйверной и трейсерной кДНК рестрикционными эндонуклеазами. К 5'-концам полученных фрагментов присоединяли дефосфорилированные короткие нуклеотидные последовательности известного состава, содержащие сайт узнавания определенной рестриктазы (адаптеры) и ставили ПЦР с гомологичными этим адаптерам праймерами.

После такой обработки драйвер и трейсер представляют смесь фрагментов приблизительно одинакового размера. Они использовались для вычитания. Далее адаптеры удаляют и к трейсерным ампликонам присоединяют новые адаптеры. После стадии гибридизации проводили ПЦР с праймером, который соответствовал части последовательности нового адаптера. Амплификации будут подвергаться только двухцепочечные гибриды трейсера, имеющие участки для связывания праймера. Каждый новый этап «вычитание-гибридизация» приводит к обогащению специфическими последовательностями, которые затем клонируют и анализируют.

Метод RDA успешно используется для конструирования кДНК библиотек, поиска и идентификации генов, дифференциально экспрессирующихся в ходе различных биологических процессов или под воздействием внешних факторов.

Одним из высокотехнологических методов изучения ДГЭ считается *Gene Calling*. Он основан на возможности анализа остатков транскриптов, образующихся в процессе расщепления кДНК рестрикционными эндонуклеазами. После этого фрагменты генов лигируют и включают в метку, используя при этом 5-флуороскамин. С целью амплификации в реакции ПЦР в качестве адаптора используется 3-биотин. Конечный этап процесса — электрофорез в полиакриламидном геле.

К сожалению, все эти методы в полной мере не соответствуют задачам фармакологического анализа. При их применении трудно рассчитывать на полную идентификацию всех генов, экспрессирующихся в ответ на действие определенного лекарственного

препарата и, соответственно, на понимание механизмов его действия. В то же время они дают возможность создания кДНК — библиотек и лишь с их помощью можно выявлять новые гены.

Отметим, что конечным результатом ДГЭ, которая возникает на внешний сигнал (лекарство), является изменение количества и набора белков, которые продуцируются одной и той же группой (кластером) генов. Какую ценность может представить такая информация для фармакологу? Это:

- информация о развитии патологий, зависящих от определенных генов;

- установление механизмов действия лекарств;

- определение токсичности и побочного действия;

- клинические последствия взаимодействия препаратов;

- массовый скрининг;

- фармакогенетические аспекты.

Все перечисленные позиции отражают идеальное положение дел в фармакогеномике. Некоторые из них реализованы уже сейчас, другие — ждут своего времени.

По данным литературы последнего десятилетия известно, что большинство болезней характеризуется определенным профилем экспрессии генов. Сравнение их профилей в норме и при патологии позволяют выявить гены, вовлеченные в этиологию и патогенез того или иного заболевания. Так, R. A. Heller et al. [638] использовали чип, который содержал около 100 генов, предположительно участвующих в развитии воспаления. При сравнении кДНК из тканей больных ревматоидным артритом и колитом показал качественное сходство профилей экспрессии большинства генов, в том числе интерлейкина-3, хемокина Ggroa, матричной металлоэстеразы и др. Это подтвердило единый принцип развития воспаления при данных заболеваниях. Одновременно были выявлены гены, специфически экспрессирующиеся лишь при ревматоидном артрите (тканевой ингибитор металлопротеазы 1-ферритин, *Mn*-супероксиддисмутаза, которые могут стать мишенями для лекарственных препаратов.)

Проведенный с помощью микрочипов анализ иРНК продуктов различных опухолей позволил установить около 50 000 генов, дифференциально экспрессирующихся при различных формах рака. В частности, для клеток рака молочной железы была выявлена повышенная активность 280 генов. Предполагается, что поиск лекарственных средств, направленных именно на эти гены, представляется наиболее перспективным с целью лечения рака молочной железы [639].

Примером успешного использования метода Gene Calling является оценка ДГЭ в условиях патологии ожирения и лечения этой болезни лектином [640]. С этой целью были использованы беспородные мыши (C57BL/6) и линия (OB/OB), имеющая склонность к ожирению. В обоих случаях обе линии были контрольными и опытными. Определение ДГЭ было проведено в органах-мишенях (гипофиз, жировая ткань, печень и гипоталамус). Установлено, что около 2 % экспрессированных генов являются причиной ожирения. Использование лектина в течение недели приводило к нормализации показателей только у 10 %. Благодаря этому методу были идентифицированы в гипофизе ранее неизвестные гены и установлены некоторые механизмы взаимодействия генов и лектина, что сказывалось впоследствии на регуляторной функции, например на уровне адренокортикотропного гормона [640].

Клинические последствия взаимодействия лекарств в результате генной экспрессии могут быть проиллюстрированы на примере препаратов резулин, косикор и тасмар [641]. Каждый препарат в свое время прошел полные доклинические и клинические испытания, в которых не было обнаружено отрицательного действия этих лекарств. Впоследствии оказалось, что у незначительной части пациентов, в частности тех кто употреблял резулин (35 из 600 тыс. пациентов) наблюдалось поражение печени.

Детальное исследование причин токсичности препаратов показало, что в некоторых случаях происходит экспрессия генов с последующим нарушением активности CYP4503A4. Образующиеся метаболиты резулина или косикора могут

взаимодействовать с другими препаратами, которые употребляли пациенты, вызывая гепатотоксичные эффекты.

Специалисты в области фармакогеномики интенсивно работают еще в одном перспективном направлении, связанном с применением микрочипов, а именно, возможностью массового скрининга вновь синтезированных химических соединений на предмет проявления специфической биологической активности. Потенциальные лекарственные средства можно отбирать на основе сопоставления характера экспрессии с известными, сходными по механизму действия лекарственными средствами («эталоны»). В таких случаях информация обо всех химических соединениях, обладающих характерным профилем экспрессии, суммируется в компьютерных базах данных.

Для сопоставления эффектов различных веществ, создается матрица расстояний на основе корреляции тех генов ДГЭ, которых отличается более чем в 3 раза в любом эксперименте. Кластеризацию рассчитывают с помощью соответствующих программ, например, КИТСН. Формирование кластеров лекарственных препаратов на основе информации о профиле экспрессии генов идентично подходу с анализом «структура—активность».

В связи с регуляцией экспрессии генов, имеющих непосредственное отношение к фармакологии отметим еще два методических подхода, дающих возможность манипулировать их активностью. Во-первых, это создание (синтез) РНК-репрессоров с *антисмысловой* последовательностью нуклеотидов. Такие технологии используют преимущественно короткие антисмысловые последовательности. Основным методом выбора олигонуклеотидов является «прогулка по мРНК». Особое внимание к этой технологии возросло в связи с официальным разрешением в 1998 г. первого лекарственного средства, созданного на основе молекулы тиофосфатного аналога олигодезоксирибонуклеотида, используемого для лечения цитомегаловирусных инфекций [642].

Во-вторых, стратегии *псевдокомплементарности* пептидноолигонуклеотидных синтетических полимеров с успехом

используются в борьбе с антибиотикорезистентными микроорганизмами.

Наличие большого количества генов в организме эукариот, являющихся объектом исследования фармакогеномики делает необходимым создание структуры, позволяющей искать, собирать, перерабатывать и сохранять соответствующую информацию. Круг интересов геномики, в целом, определяет *биоинформатика*. Ее составной частью по аналогии с хемоинформатикой служат большие библиотеки.

Экспериментальный поиск одного гена занимает недели и месяцы работы целой лаборатории. Компьютерные подходы сделают это за считанные минуты, если определена последовательность нуклеотидов организма или имеются надлежащие алгоритмы поиска. Различные программы биоинформатики используют для поиска генов, поиска регуляторных сигналов в ДНК, предсказания структуры и функции белка, его локализации в клетке, профилей ДГЭ, для реконструкции метаболизма. Реконструкция метаболических реакций, происходящих в разных клетках и тканях, будет одним из следствий расшифровки генетической информации.

Разрабатывается также направление применения микрочипов с целью выявления лекарственного полиморфизма, лежащего в основе разнообразия индивидов на один и тот же лекарственный препарат (раздел 10.1).

В целом, биоинформатика обеспечивает соответствующими информационными материалами не только фармакологию (R&D), но и целый ряд биологических дисциплин (рис. 12.6).

12.3. ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ХИМИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Конечным результатом конструирования, виртуального скрининга химических веществ, определенной биологической

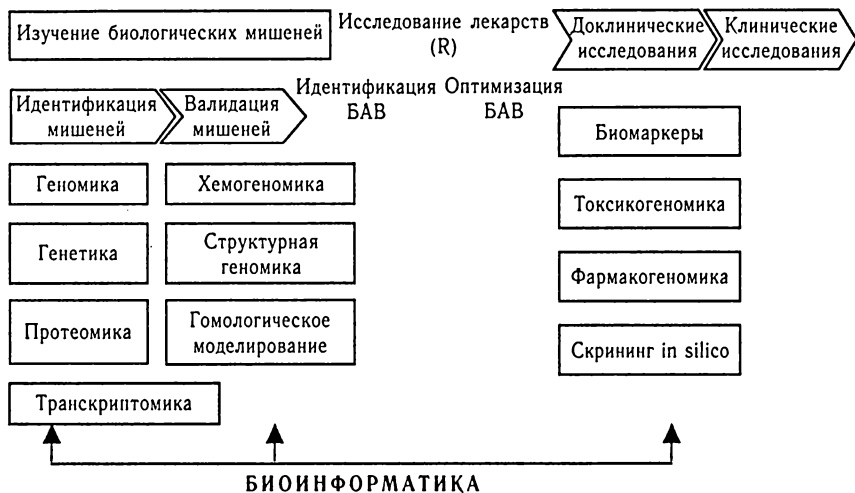


Рис. 12.6. Взаимосвязь биоинформатики с другими направлениями биологических и фармакологических дисциплин [643]

активности является синтез одного из представителей или группы родственных соединений.

Синтез — неотъемлемая часть органической химии, которая изучает законы химических превращений, свойств и способы получения и использования органических веществ.

Цели, стоящие при проведении синтезов могут быть разнообразными. В нашем случае — получение ранее не описанной структуры, которая по теоретическим размышлениям должна иметь необходимые свойства.

Независимо от цели, для которой синтезируется соединение, задача состоит в том, чтобы получить ее из доступных предшественников, наиболее эффективным и экономическим способом в лабораторных условиях. В классическом варианте лабораторные синтезы проводят отдельными «порциями».

Большинство синтезов включают более одной стадии и конечный продукт реакции может быть получен практически неограниченным числом способов. Планирование таких синтезов временами превращается в головоломную задачу. Поэтому

проблема заключается в том, чтобы выбрать наиболее подходящий путь по отношению к числу возможных стадий, выхода конечного продукта и использование реагентов. Планирование многостадийного синтеза можно осуществлять в обратном (ретро-синтетическом направлении), но не следует исключать и прямой (синтетический) путь.

Все эти подходы могут быть осуществлены в процессе компьютерного и реального синтезов.

12.3.1. КОМПЬЮТЕРНЫЙ СИНТЕЗ

Одной из наиболее важных научных разработок по применению компьютеров в органической химии является поиск возможных путей синтеза веществ, получивший название в литературе «компьютерный синтез», сокращенно КС.

Большинство программ КС в процессе работы, как при прямом, так и при обратном направлении поиска основаны на построение «*дерева синтеза*». Для этого используется необходимое вещество (химическая система, ХС), в случае ретро-синтетического подхода, а при планировании прямого направления в ХС входят несколько веществ.

При осуществлении программы КС в нее вводится структура соединения, входящая в заданную ХС. Программа генерирует набор предшественников заданной ХС, опираясь на эмпирические или логические инструкции, которые заложены в соответствующую программу. Такая процедура может повторяться для всех или части структур, которые генерировались на первой стадии, т. е. до того времени пока не будут выполнены некоторые заданные условия окончания построения «дерева синтеза» [644].

В целом задачу выбора и оценки путей синтеза можно определить как намерение сократить «дерево синтеза», т. е. исключить из него химические преобразования и вещества, которые

не удовлетворяют исследователя тем или иным критериям отбора. Критерии отбора позволяют значительно сократить «дерево синтеза», а также упорядочить генерацию предшественников заданной ХС таким способом, чтобы в первую очередь программа генерировала наиболее вероятные или экономичные пути синтеза.

Специфика задания КС определяет следующие основные проблемы:

- изображение и анализ химических структур в программах КС;
- представление и анализ химических реакций (трансформаций) в программах КС;
- критерии отбора в программах КС.

Существуют множество программ КС. Одни из них — полностью оригинальные, другие представляют собой модификации, ранее разработанных [645]. Практически все они используют возможности введения структуры заданного КС в виде рисунка, который достигается с помощью специальных графических приборов (графический дисплей, световое перо и т. д.). Полученная графическая информация преобразуется в некоторое внутреннее представление структуры в программе.

Доступ к формализованным описаниям способов представления химических реакций в КС может быть двух видов. Во-первых, *эмпирическое* направление КС, использующее закодированные сведения об известных органических реакциях. Во-вторых, *неэмпирический* КС, когда трансформации генерируются логико-комбинаторным путем, без привлечения фактических сведений. С этой целью, обычно, используется набор определенных логических инструкций или комбинаторные алгоритмы.

В настоящее время многие программы неэмпирического КС включают и взаимодействие с банками данных, обращение к которым позволяет производить химическую оценку полученных результатов, т. е. позволяет реализовать эмпирический критерий отбора.

Что касается представления и анализа химических реакций в программах КС, то они относятся к эмпирическому направлению и используют в своей работе *библиотеки трансформаций* [646], имеющие общие черты. Они включают информацию (описание) о структурных фрагментах, которые обязательны в заданной ХС, для того чтобы данная трансформация могла осуществляться. Кроме того, описание включает также перечень структурных изменений, которые нужно произвести, чтобы генерировать структуры, соответствующие результату применения данной трансформации в заданной ХС. Наконец, обязательно присутствует идентификатор каждой трансформации.

Наиболее важная проблема КС — создание и формализация критериев отбора. В программах эмпирического КС используют чаще всего следующие стадии поиска:

- 1) выбор определенной стратегии синтеза, которая ограничивает число и вид превращений, доступных в библиотеках трансформаций;

- 2) оценка или отбраковка конкретных трансформаций до их применения в заданной ХС;

- 3) оценка или отбраковка конкретных предшественников, заданной ХС, полученных в результате трансформации.

Выбор надлежащей стратегии осуществляется, как автоматическим способом, так и при участии пользователя. Обычно используются несколько стратегий, позволяющих отыскать весьма эффективные пути синтеза. Как правило, к основным стратегиям относят следующие типы [647]:

- 1) стратегия применимости, т. е. поиск в библиотеках трансформаций всех превращений, которые применимы в заданной ХС;

- 2) стратегии, ориентированные на трансформации, т. е. поиск в библиотеках трансформаций известных, достаточно надежных реакций, с помощью которых можно осуществить необходимый синтез заданной ХС;

- 3) структурно-ориентированные стратегии, т. е. поиск трансформаций, приводящих именно к таким предшественникам

заданной ХС, которые содержат определенные структурные фрагменты;

4) топологические стратегии, т. е. поиск трансформаций, приводящих к разрыву одной или нескольких связей, в результате чего происходит упрощение структуры исходной ХС;

5) стереохимические стратегии, т. е. поиск трансформации, с помощью которых можно осуществить синтез заданного КС с определенной конфигурацией всех реагентов;

6) стратегии, ориентированные на функциональные группы, т. е. поиск трансформаций, осуществляющих введение, удаление, защиту или их изменение.

Значительные количества стратегий дает возможность удовлетворить любые запросы оператора, однако делает процесс длительным. Для решения этой проблемы в каждой библиотеке трансформаций всем структурным фрагментам присваивают соответствующие рейтинги. Наиболее высокие показатели имеют структурные фрагменты, при образовании которых осуществляется одновременное замыкание наибольшего числа связей (реакции Симмонса—Смитта, Дильса—Альдера).

Что касается химических превращений, то в каждом разделе библиотек они расположены в порядке уменьшения приоритетности синтетических реакций. Наивысший рейтинг имеют реакции введения функциональных групп; затем следуют реакции построения молекулярного скелета, реакции изомеризации, реакции введения защиты, удаления защиты функциональных групп. Реакции фрагментации имеют самый низкий рейтинг, поскольку такие трансформации усложняют структуру заданной ХС.

Вопрос оценки вероятности протекания реакции решается в программах КС с помощью формальных и эмпирических критериев отбора. Трансформация считается формально возможной, если в заданной ХС присутствует структурный фрагмент, формально необходимый для осуществления данной трансформации. Эмпирические критерии отбора реализуются на основе более глубокого анализа структуры заданной ХС, условий

реакции, реагентов и т. д. Окончательная оценка (рейтинг) трансформации определяется в результате выполнения ряда тестов, содержащихся в самом описании трансформации.

В некоторых случаях кроме тестов используются так называемые «*списки целей*», которые содержат указания о требуемых изменениях скелета и функциональных групп. Параллельно с этим, происходит отбраковка превращений из библиотек трансформаций если их тип не соответствует ни одной из целей, перечисленных в списке.

Формальная корректность генерированных структур в некоторых программах ретро-синтетического направления определяется дополнительными критериями, среди которых основное место занимают специальные банки данных (каталоги) доступных соединений.

Следовательно, в решении задач планирование синтеза биологически активных веществ, прогнозирование направления реакций значительную роль играет КС. Использование такого методического подхода значительно упрощает реальный синтез, создает предпосылки для разработки высокопродуктивных технологий.

12.3.2. КОМБИНАТОРНАЯ ХИМИЯ

В рамках комбинаторного анализа, на базе которого построены принципы конструирования лекарств, виртуального скрининга, компьютерного синтеза, а в некоторых случаях и изучения механизмов реакций составлены банки данных и библиотеки.

Комбинаторная химия, предметом которой является использование комбинаторных процессов для получения (синтеза) определенных рядов соединений из наборов строительных блоков, также пользуется библиотеками. Однако они относятся к так называемым синтетическим и представляют собой своего рода коллекции (наборы).

Начало создания синтетических библиотек относится к началу 70-х годов прошлого века. Этот период ознаменовался внедрением в синтетическую химию комбинаторных технологий. Они стали успешными благодаря параллельным твердофазным методам синтеза пептидов. В них были объединены процессы формирования амидных конструкций (связей) с оптимизацией выхода определенного количества разнообразных пептидов в одной смеси [648]. Такие технологии значительно отличались от традиционных методов синтеза органических низкомолекулярных веществ.

Некоторые приемы комбинаторных технологий синтеза коротких пептидов в зависимости от модификации метода получили в литературе даже экзотические названия: «Pin», «tea bag», «Spot», которые могут быть определены, как наличие продуктов синтеза (соединений) в соответствующих емкостях (мешочках, каплях и др.).

Обычно комбинаторные библиотеки, содержащие вещества, различающиеся по нескольким параметрам, синтезируются путем последовательного слияния мультифункциональных блоков с ортогональными защитными группами, с использованием Меррифилдовской концепции твердофазного синтеза [649]. После присоединения первого блока твердофазная основа начинает выполнять функции защитной группы для последующего слияния. При последующем отделении ортогонального защитного блока следующие блоки присоединяются поодиночке до тех пор, пока не будут заняты все доступные для них позиции. После оптимизации амидного соединения на твердой фазе оно начинает интенсивно использоваться в комбинаторном синтезе. Несколько подходов к синтезу, которые включают в себя либо комбинирование различных ионообменных смол («разнопарная рекомбинация (DCR)», «сплит-синтез», «почастевое смешивание») или использование смесей начальных реагентов, в настоящее время используются наиболее часто для слияния строительных блоков в единую комбинаторную библиотеку.

В процессе синтеза химической библиотеки необходимо учесть два важных аспекта: приблизительное равенство, по количеству веществ, участвующих в реакциях и необходимость проведения синтеза с высокими показателями продуктивности. Таким образом, различные конструктивные блоки должны быть помещены во все нужные позиции в количествах, как можно более близких к эквимоллярным. Процесс DCR предполагает нанесение каждого функционального блока на отдельную порцию ионообменных смол, а затем перемешивания этих частей [650]. С учетом статистических особенностей распределения носителей на каждой стадии процесса, особое внимание следует уделить участию в реакции соответствующего количества носителя с каждым видом реагента. После прохождения реакции химическая библиотека может быть смыта с носителей для проведения биологических исследований, либо оставлена на твердых носителях для проведения твердофазных реакций.

Самое существенное ограничение, присущее методу DCR, определяется его природой. После того, как определено место вещества в реакционной схеме, необходимо присоединять следующие вещества в строгом соответствии с количеством реакционноспособных участков на носителе, для чего носители, содержащие каждый из функциональных блоков, в ходе всех последующих реакций должны быть разделены. Таким образом, на практике ограничивается вариативность получаемой библиотеки.

Метод реакционной смеси [651], позволяет наносить смесь на носитель на любой стадии реакционной схемы. Метод реакционной смеси предполагает использование при синтезе химических библиотек заранее определенные количества реагентов, находящихся в эквимоллярном соотношении. Реакция присоединения структурных блоков в условиях избытка аминогрупп часто используется в твердофазном синтезе ввиду различий в реакционной способности, участвующих в реакции веществ. При синтезе с использованием смеси компонентов может возникнуть ситуация, когда данные компоненты вступают в реакцию

в неэквивалентных количествах, что приводит к неравномерному распределению структурных единиц в составе библиотеки. Использование реакционных смесей, таким образом, требует углубленных знаний о структуре и кинетических особенностях реакций компонентов смеси. Преимуществом данного метода является то, что при фиксированных условиях реакции и правильном подборе компонентов смеси полученная библиотека будет содержать большее количество отдельных компонентов. Например [645], реакционная смесь, содержащая три различные аминокислоты (А, В, С), составляющие в трипептидном синтезе взаимодействие $3 \times 3 \times 3$ (рис. 12.7). Такая техника использует три начальные смеси ионнообменных смол (шарики), связанные с отдельными аминокислотами, которые взаимодействуя с другой на мицелле смолы, образуют дипептиды, которые затем смываются для дальнейшего присоединения соответствующей аминокислоты. Повторение процесса три раза приводит к генерации комбинаторной синтетической библиотеки трипептидов в количестве 27, образующихся всего в шести реакциях. Понятно, что в случае взаимодействия $10 \times 10 \times 10 \times 10$ образуется 10 000 веществ, полученных всего с помощью пятидесяти реакций.

Для достижения эквимольного взаимодействия реагирующих компонентов имеются два основных подхода. Во-первых, значительный избыток реагирующих компонентов используется для получения реакции с кинетикой псевдопервого порядка, и количество структурных блоков в реагирующей смеси регулируется в соответствии с их различной реакционной способностью, т. е. чем выше кажущаяся реакционная способность вещества, тем меньше его концентрация в реакционной смеси. Важно отметить, что относительные уровни реакционной способности приблизительно равны таковым для связанных со смолами реагентов. Эти уровни определяются относительной концентрацией каждого реакционного блока в соответствии с его степенью связывания в эквимольной смеси.

Данное положение справедливо для реакционных смесей таких реагентов, как альдегиды, карбоновые кислоты, аминокислоты

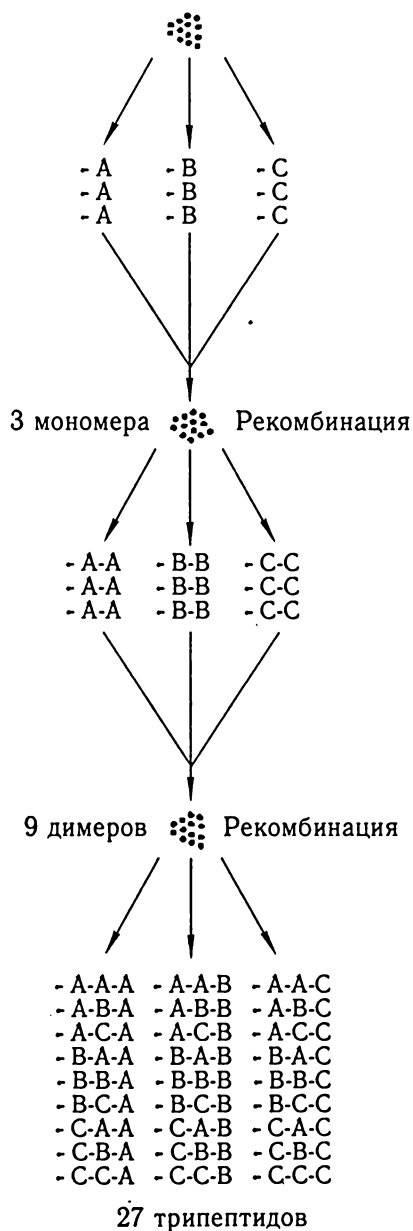


Рис. 12.7. Схема синтеза трипептидов методом реакционной смеси

и т. п. Метод реакционной смеси был также применен при синтезе гетероциклических соединений, включая цикломочевину, циклотиомочевину и бициклогуанидиновую библиотеку [649].

Второй подход состоит из внесения в реагирующую смесь двойного количества структурных реакционных блоков в приблизительно равных (эквимольярных) концентрациях. Это позволяет исключить присоединения к носителю части структурных блоков в количествах, больших чем другие. Потенциальным недостатком, присущим этому подходу, является то, что соединение блоков является реакцией второго порядка, чей порядок определяется обоими компонентами реагирующей пары. Следовательно, после того, как смесь реагентов соединяется со связанными с ионообменными смолами в рамках такого метода, некоторые комбинации, получаемые в итоге, образуются в сильно различающихся количествах, несмотря на эквимольярную структуру первоначальной смеси.

При синтезе смесевых комбинаторных библиотек нужно учитывать много различных факторов. После отработки реакционной схемы она должна быть оптимизирована для получения возможно большего разнообразия веществ с наибольшей возможной продуктивностью. Это подразумевает тот факт, что схема синтеза должна быть протестирована с использованием контрольных веществ, полученных из наиболее и наименее реакционноспособных блоков. Оптимальными условиями являются те, при которых может быть получено удовлетворительное количество искоемых веществ при максимально возможном их разнообразии. Методы, используемые для определения количества и степени чистоты продуктов, также являются факторами воздействия на систему. Авторы [649] определяли чистоту веществ по УФ поглощению в полосе 215 нанометров. В зависимости от имеющихся хроматофоров, может быть получен широкий спектр веществ в зависимости от их молярного поглощения. Чистота вещества также может быть определена исходя из измерения ионного потока при масс-спектрометрии. Однако они установили, что ионизация даже в одном классе

веществ может сильно варьировать. Альтернативой является определение параметров светорассеивания. Снова-таки, различные вещества одного класса могут при этом давать сильно различающиеся результаты. Таким образом, анализ следует проводить, исходя из структурных особенностей полученных веществ.

При определении общих условий реакций важным пунктом является синтез серии контролей через некоторые промежутки времени для определения продуктивности синтеза. Также весьма осторожно нужно подходить к градуировке параметров реакции. Хотя начальные опыты могут быть произведены с количеством реагентов, колеблющимся от миллиграммов до граммов твердой основы, синтез библиотеки требует до ста граммов смол.

Также должна быть предварительно определена степень вариативности метода синтеза. Каждый из запланированных к использованию в синтезе реакционных блоков должен быть проверен в реакциях с контролем до включения в библиотеку. После определения условий прохождения реакции, обычно варьируют первоначальными соединениями в комбинациях с каждым из предполагаемых блоков библиотеки (как это показано в схеме синтеза библиотека бициклических гуанидинов) [650]. Комплекс начальных реагентов был подобран с расчетом на получение большого количества веществ достаточно высокой чистоты при средних значениях скорости реакции. Таким образом, появилась возможность изучить эффект каждого структурного блока в ходе реакции. Существует вероятность, что при таком подходе часть нежелательных реакций между структурными блоками останется незамеченной. Контроль таких реакций был учтен при разработке общих характеристик реакционного процесса [651].

Однажды определенный для синтеза химической библиотеки структурный блок обуславливает синтез контрольных веществ одновременно с синтезом библиотеки, как контрольных показателей полноты реакции и ее продуктивности. При синтезе библиотеки из смеси такой контроль приобретает чрезвычайно большое значение. Отдельные контрольные вещества

могут быть выделены на любой из стадий реакционного процесса и быть показателем полноты прохождения реакции.

После выполнения синтеза масс-спектрометрический анализ используется для подтверждения того, что получен требуемый перечень веществ. Отдельные контрольные вещества, полученные при синтезе, могут быть использованы в сочетании со сме-совой библиотекой для получения различных данных об исследуемом классе молекул.

В целом, большое количество примеров успешного использования веществ, полученных из библиотек смесей, демонстрирует потенциальные возможности поиска веществ с заданными свойствами. Прежде чем проиллюстрировать определенные успехи данного направления приведем пример простого и понятного синтеза, взятого из работы [653]. В данном случае синтез проводился 5×5 соединений и их смесей. В реакциях присоединения, с одной стороны, были взяты 5 аминокислот: 4-аминомасляная (1); 6-аминокапроновая (2); 8-аминокаприловая (3); 10-аминодекановая (4) и 12-аминодекановая (5), с другой стороны, соответствующие хлориды: ацетилсалицил- (а); бензоил- (б); 2-анизол- (в); флюоробензоил- (г) и 2-толуил- (д).

В параллельных синтезах используется соответствующая матрица (решетка). Это значит, что первые 5 синтезов включали смесь аминокислот (1—5), которые вносились к отдельным хлоридам. Другие 5 синтезов, наоборот, использовали смесь хлоридов (а—д), которые вносились к отдельным аминокислотам. Таким образом, создается определенная решетка (табл. 12.5), которая содержит 10 смесей (5 по вертикали и 5 по горизонтали) N-замещенных аминокислот (продуктов реакции в смеси 25).

Удобство параллельных синтезов заключается не только в том, что увеличивается продуктивность синтеза, но и интенсифицируется биологический скрининг, так как смесь содержит одновременно 5 соединений. Тем не менее, достоверный скрининг может быть гарантирован только в том случае когда он проводится перекрестно (табл. 12. 5). Тогда, сравнивая биологическую активность смесей по горизонтали и по вертикали

Таблица 12.5

**Схематическое изображение параллельного синтеза (5×5)
и антикоагуляционная активность ($M \pm m$)
индивидуальных соединений и их смесей**

Синтоны	1	2	3	4	5	Смесь
а	1а(32±5)	2а(24±2)	3а (125±24)*	4а (153±50)*	5а (86±23)*	1а—5а (298±59)
б	1б(22±1)	2б(33±3)	3б(21±1)	4б (31±5)	5б(24±3)	1б—5б (150±41)
в	1в(26±4)	2в(31±10)	3в(27±2)	4в (50±14)	5в(54±8)	1в—5в (68±20)
г	1г(22±1)	2г(28±3)	3г(25±2)	4г (27±2)	5г(33±5)	1г—5г (45±4)
д	1д(24±2)	2д(26±2)	3д(23±1)	4д (34±3)	5д(30±2)	1д—5д (88±17)
Смесь	1а—1д (34±1)	2а—2д (35±6)	3а—3д (168±53)*	4а—4д (242±53)*	5а—5д (128±22)*	—

можно обнаружить достоверно активные соединения, например 3а, 4а, 5а. В тоже время могут возникнуть некоторые сомнения относительно активностей соединений 1б—5б, которые сами по себе неактивны, а в смеси обладают довольно высокой активностью. Авторы [653] относят этот парадокс к возможному взаимодействию веществ в смеси.

Техника приготовления большого количества веществ в соответствующих смесях особенно полезная для лиганд-рецепторного изучения [643]. И если, в случае параллельного синтеза 5×5 мы в десяти смесях определяем активность 25-ти соединений, то увеличение параллельности до 10×10 даст 20 смесей скрининга т. е. для 100 веществ.

Библиотеки смесей с успехом используются в широком перечне биологических исследований [649]. Благодаря им были идентифицированы новые белковые ингибиторы, агонисты и антагонисты специфических рецепторов, антимикробные

и противовирусные вещества, а также В- и Т-клеточные антигенные детерминанты. Библиотеки содержат широкий круг химических соединений — от низкомолекулярных до пептидов.

В то время когда польза комбинаторных библиотек некоторой частью ученых ставится под сомнение, сегодня уже известны более 100 отдельных веществ, изолированных из них. Такие работы были проведены 50 отдельными группами [649].

Количество соединений, полученных с помощью библиотечных смесей колеблется в широких пределах (от 10 и меньше до 10^{14} отдельных веществ). В отдельной смеси может быть $10\text{—}2 \times 10^{10}$ веществ. Степень активности отдельных соединений, изолированных из библиотек не зависит от их сложности и химической природы.

Биологические исследования веществ комбинаторных библиотек включали, как рецепторные связывания, так и полный цикл исследований. Среди рецепторных исследований большая их часть (33 %) относится к известным G-протеинзависимым рецепторам (нейропептидных), а также опиоидных, брадикининовых, соматостатиновых, нейрокининовых и др. Соответствующие библиотеки содержали пептиды, пептидомиметики и некоторые гетероциклические соединения количеством от 25 до 50 миллионов. Активность некоторых из них колебалась от 50 р моль до 850 нмоль. Среди идентифицированных лигандов около 60 % относились к антагонистам, остальные — к агонистам [654].

Некоторые публикации описывают пути поиска веществ в библиотеках с В- и Т-клеточной специфичностью [649]. Основными достижениями этого направления стали:

- 1) определение активных лигандов Т-клеток и антител;
- 2) получение ценных пептидов в качестве терапевтических вакцин;
- 3) изучение некоторых принципов иммунологического узнавания.

Приблизительно 15 % работ посвящены синтезу и определению активности ингибиторов синтеза белков. Ферментативная специфичность в тех исследованиях по ряду черт оказалась

пограничной между аналогичными показателями для рецепторов и антител, что объясняет распределение данных активности от их микромолярных до наномолярных значений. Обнаруженная активность в большинстве случаев зависит от типа биологической мишени действия лекарств, а не от структуры библиотеки. Например, наномолярная активность была обнаружена и в гексапептидной, и в гетероциклических библиотеках.

Структура синтетических библиотек может быть разнообразной и она зависит от реагирующих компонентов. Например, библиотека тетрагидроизохинолинов (43 тыс. соединений) была образована 11-ю защищенными аминокислотами, 38 — альдегидами и 51 — аминами [655]. Библиотека из 22 540 дикетопиперазинов была синтезирована с использованием α -бромкарбоновых кислот и некоторых аминов. Библиотека дикетифлюраминов (980 веществ) создавалась методом параллельных синтезов 7 аминокислот \times 20 аминов \times 7 кислот [656].

Другие низкомолекулярные растворимые библиотеки включают: 1) синтез 4-триазолидинов и 4-метатиазонинов, с использованием трехкомпонентной системы; 2) синтез гидантоинов и тиогидантоинов, использующий изоцианат и тиоизоцианат в качестве синтонов для твердофазной основы; 3) синтез фосфорамидатных комбинаторных библиотек путем окисления первичных и вторичных аминов в присутствии связанных аминокислот; 4) синтез дигидропиридинов, пиридинов и пиридо(2, 3-d)-пиримидинов; 5) синтез библиотек, содержащих 1296 N-ацилированных дипептидов [649].

В последнее время в комбинаторной технологии появился новый подход, имеющий название «библиотека из библиотек». Его суть заключается в том, что часть соединений на соответствующей стадии синтетической библиотеки используется для построения новой полноценной составной. Таким способом были получены некоторые дипептиды и производные линейной мочевины [657].

В заключение отметим, что учитывая огромное влияние комбинаторной химии в развитии науки о лекарствах в 1998 г.

журнал Science [658] отнес это направление к наиболее весомым достижениям научной мысли, что позволило сделать значительный прорыв в данной области естествознания.

12.3.3. АВТОМАТИЗАЦИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Автоматизация в химии биологически активных веществ является также частью общей тенденции развития высокопродуктивных технологий. Ее необходимо понимать как оптимизацию создания лекарственных средств, сокращение времени, а отсюда эффективность целенаправленного синтеза соединений. Выполнение такой задачи требует объединения эффективных технологий с оборудованием, дающих возможность обеспечить качественный синтез веществ.

По традиции поиск веществ с полезными биологическими свойствами сопровождается синтетическими работами, в которых получают отдельные, чистые вещества или их группы. Стадия синтеза соединений включает высокопрофессиональную, однако часто ручную процедуру. Появление геной инженерии и высокопродуктивных скрининговых технологий требует незначительных количеств веществ для их биологического анализа. Тем не менее они должны быть обеспечены не только соответствующими реагентами но и автоматизированными системами, а также информационным сопровождением.

В химическом синтезе автоматизированными могут быть практически все процессы, если в них существуют непрерывные стадии. Наиболее интенсивным стадиям должно уделяться значительное внимание, даже если в них имеется определенная часть операторского вмешательства.

Для применения автоматизации в процессах синтеза существует несколько простых и понятных инструкций. Во-первых, это информация о наличии инструментов, приспособленных

для химического производства. Во-вторых, возможности автоматизированного химического производства могут быть расширены за счет взаимозаменяемости синтетического оснащения. Например, существуют разработки [659], используя которые можно проводить высокопродуктивные процессы синтеза, как в растворах, так и твердых фазах. Проверка всех производственных процессов должна предшествовать переходу от традиционного синтеза к автоматизированному. Существуют и предостережения для процессов, которые могут быть автоматизированными. Это относится прежде всего к новым, разрабатываемым технологиям, для которых необходимо предварительное изучение. И, наоборот, возможна ситуация когда процесс производства химической продукции может быть автоматизирован, но он не имеет смысла, так как исследователю необходимо незначительное количество веществ.

Необходимо подчеркнуть важность использования высококачественных информационных технологий для внедрения автоматизированных систем в органическом синтезе. Большинство фармацевтических фирм имеют собственные разветвленные базы данных, включающие в себя перечень химических веществ и набор технологий. Существуют и коммерческие информационные системы, например, программный пакет RADICAL [660].

В ближайшем будущем, в дополнение к автоматизированным рабочим системам будут присоединены централизованные высокопродуктивные модули, дающие возможность получения соединений последнего поколения. Они будут содержать синтетические платформы, что позволит одновременно сохранять, манипулировать реактивами, вести очистку, анализировать определять количество, сортировать и маркировать вещества. Ключевой концепцией дизайна таких новых модулей станет возможность проводить развертывание новых технологических линий со специфическими видами сервиса. Основной чертой операций рационального процесса будет возможность моделирования работ и руководить соответствующими рабочими станциями и роботами.

Подводя итог тенденциям развития и становления новых научных направлений, определенных как высокопродуктивные технологии изучения и внедрения лекарственных средств, необходимо обратить внимание, что они не возникли спонтанно, а базируются на историческом развитии этой отрасли. События, которые имели место в прошлом веке в этой отрасли представлены на рис. 12.3 [661].

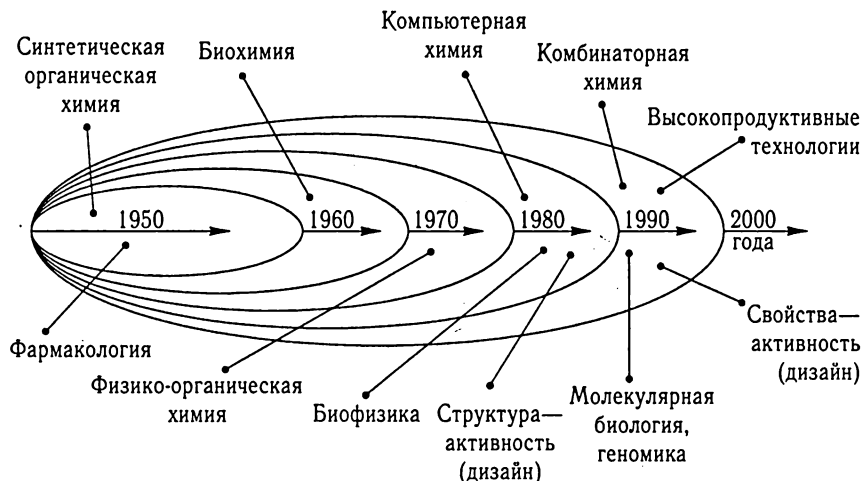


Рис. 12.8. Хронологические этапы становления и развития науки о лекарствах

Благодаря развитию фундаментальных и прикладных исследований, стало возможным придать процессу поиска и внедрения в медицинскую практику новых (оригинальных) лекарственных средств динамический характер. Особое значение приобрели информационные технологии, позволившие проводить химические и биологические исследования в опытах *in silico*.

Необходимо признать, что опыты *in silico* (дизайн, скрининг, фармакогенетические аспекты) ни в коей мере не могут заменить также традиционные методы, как *in vivo*, *in situ*, *in vitro*, а только их дополнить. Особая ценность опытов

in silico касается ранних наиболее трудоемких этапов создания лекарственных средств. Можно с уверенностью сказать, что этот метод имеет большое будущее, которое связано с развитием компьютерных систем и их сетей, а также соответствующих носителей информации, как доступных дополнений, так и инструментов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Необходимо прежде всего отметить, что в последние годы, как снежный ком, нарастает число публикаций, касающихся изучения всех аспектов всасывания, распределения, метаболизма, элиминации лекарств, а также биологического ответа организма на их введение (LADMER). Работы в этой области публикуются не только в фармакологических, но и во многих других журналах: физиологических, биохимических, химических, физических и математических. Такой интерес к данной проблеме представителей различных отраслей науки обусловлен прежде всего тем, что ее решение позволяет подойти к пониманию самой сути биологической активности вещества — к молекулярному механизму его действия. В свою очередь такие познания дают ключ к решению целого ряда вопросов, связанных с конструированием, отбором (скринингом) и внедрением в медицинскую практику новых (оригинальных) фармакотерапевтических средств.

Состояние этого научного направления характеризуется обилием фактов, однако недостаточной их систематизацией и обобщением, частым отсутствием или неточностью количественных данных, слабой разработкой теоретических вопросов. В то же время для решения этих задач все большее значение приобретают фундаментальные химические и биологические исследования. Особенно удачными в этом плане оказались физические (инструментальные) методы исследования и компьютерное моделирование.

В настоящей монографии нами сделана попытка обобщить и систематизировать многочисленные материалы и собственные данные, что позволило сформулировать общую концепцию реализации процессов LADMER в организме и представить ее как научное направление именуемое физико-химической фармакологией.

В целом, с нашей точки зрения, учитывая основные положения химии и биологии поведение лекарств в организме подчиняется двум закономерностям: 1) способности к передвижению или массопереносу (кинетика); 2) связыванию (рецепции) с макромолекулами, преимущественно с белками.

Вещества, которые способны связаться с белками называются лигандами. Если они претерпевают химическое превращение под действием ферментов — их называют субстратами. Лиганды, повышающие активность ферментов при связывании с ними, и не образующие продуктов реакции, называются активаторами, а ингибирующие активность фермента — ингибиторами. Лиганды транспортирующих белков только перемещаются в пространстве, не подвергаясь химическим превращениям. Если же лиганд связывается с рецептором и имитирует действие эндогенных веществ, например гормонов, его называют агонистом. Лиганды, способные связываться с рецепторами и не оказывать такого действия, но при этом препятствовать связыванию рецептора с гормоном называются антагонистами.

Несомненно, в качестве любого, а может быть и нескольких сразу лигандов может быть и лекарство, так как их структура соответствует требованиям, предъявляемым к таким веществам.

В химических терминах связывание не что иное, как химические реакции, для которых определяющим является их скорость, а отсюда им свойственно опеределение кинетики. В основе теории кинетики лежит фундаментальное положение Гульдберга и Вааге, согласно которому скорость химической реакции пропорциональна активным массам реагентов.

Следовательно, взаимодействие лекарства и биологических мишеней основано только на кинетических особенностях соответствующих процессов: транспорта, связывания с ферментами, переносчиками и рецепторами.

Выбор белка лекарством в качестве партнера по связыванию зависит от особенностей структуры, физических, химических и физико-химических свойств участвующих с обеих сторон

молекул. Реализацией такого выбора является принцип биологического узнавания.

Следовательно, биологическое узнавание — фундаментальное свойство белковых молекул, приводящее к реализации биофизико-химических свойств. Последнее следует понимать как физико-химические свойства веществ, обеспечивающие их биологическую активность.

Рецепцию лекарств биологическими мишенями можно отнести к их первичному биологическому действию. Достигается оно за счет комплементарности (соответствия) атомов или химических групп лиганда (лекарства) и активного центра белковой молекулы, состоящего из определенного количества и чередования аминокислот. Рецепция лекарства на белковой молекуле имеет двух- или трехточечный контакт, поддерживающийся химическими связями. Приоритет при этом принадлежит водородной связи. Поэтому наряду с такими дескрипторами как молекулярная масса и липофильность, водородная связь, а вернее наличие групп в молекуле лекарства-доноров и акцепторов протонов занимает ведущее место в компьютерном моделировании (QSAR).

Вторичное биологическое действие лекарств (биологический ответ) по своей сути и механизмам реализации значительно отличается у различных белковых молекул, и в целом зависит от выполняемой функции (транспорт, трансформация, фармакотерапевтическое действие).

Для транспортных белков механизм переноса лекарств через биологическую мембрану осуществляется, например, посредством сопряженного движения второго вещества,двигающегося по своему концентрационному градиенту.

Ферменты, метаболизирующие лекарства выполняют после рецепции вторичное биологическое действие (биотрансформацию) посредством коферментов, например гемопротеина в CYP450.

Агонисты не только должны иметь способность связываться с рецепторами, т. е. обладать аффинитетом, но и обладать

внутренней активностью, дающей возможность реализовать фармакотерапевтическое действие.

Следовательно, лекарственная молекула для проявления транспортных, метаболических и фармакотерапевтических свойств должна иметь, по крайней мере, три фармакофорные группы: трансфорную, метабофорную и эффектофорную (в классической фармакологии фармакофорную). Они могут на молекуле лекарства располагаться отдельно или перекрываться. Фармако-токсикологические свойства лекарственного средства, во многом, зависят как от топологии всех трех фармакофорных групп так и от их сочетания.

Таким образом, благодаря совместным усилиям ученых различных направлений биологии, химии и физики начали вырисовываться контуры здания наших познаний в области физико-химической фармакологии, и сейчас настало время остановиться и окинуть взором это здание. Здесь уместно привести слова Льюиса и Рендалла, сказанные ими много лет назад по поводу эволюции термодинамики как науки. Они сравнивали развитие науки с возведением собора и писали:

«Труд поколений архитекторов и мастеров забыт, воздвигнутые ими строительные леса давно убраны, ошибки исправлены или покрылись пылью забвения...

Но иногда нам случается войти в такое здание, когда оно еще не достроено. И тогда стук молотков, табачный дым и грубоватые шутки, которыми перебрасываются рабочие, заставляют нас понять, что все это великое строение — не более чем результат обыденного человеческого труда, но направленного к определенной цели».

Физико-химическую фармакологию в ее современном состоянии можно сравнить с беспокойной и шумной строительной площадкой, где строящееся здание еще скрыто лесами. Ремесленники многих цехов выполняют здесь свою обычную работу, причем каждая группа поглощена решением какой-то своей задачи; слышен громкий стук молотков и перебранка рабочих. Для того, чтобы составить впечатление об этой новой постройке, мы должны

обойти строительную площадку, всмотреться в то, что скрыто лесами, и затем отойти на расстояние, откуда не слышны посторонние звуки.

Увиденное, исходя из своих интересов и способности, даст возможность найти свое место на этой грандиозной стройке.

Одно- и трехбуквенные обозначения аминокислот

Аминокислота	Трехбуквенное обозначение	Однбуквенное обозначение
Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспарагиновая кислота	Asp	D
Валин	Val	V
Гистидин	His	H
Глицин	Gly	G
Глутамин	Gln	Q
Глутаминовая кислота	Glu	E
Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Тирозин	Tyr	Y
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Цистеин	Cys	C
Фенилаланин	Phe	F

Сведения о белках, находящихся в соответствующих базах данных

База данных	Тип белка	URL
48 Human ATP-Binding Cassette Transporters (48ABC)	ADME	http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm
ABC Permease Database (ABCdb)	ADME	http://ir2lcb.cnrs-mrs.fr/abcdb
ADME-Associated Protein database (ADME-AP)	ADME	http://xin.cz3.nus.edu.sg/group/admeap/admeap.asp
Cytochrome P450 Homepage of Nelson's	ADR, ADME	http://drnelson.ultmem.edu/cytochrome450.html
Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases page on CCDB	TT, ADR	http://mrb.mddk.nih.gov/cddb/display.php?section=4
Cytochrome P450 Drug Interaction Table	ADR, ADME	http://medicine.iupui.edu/flockhart/
Directory of P450-containing Systems	ADR, ADME	http://www.icgeb.trieste.it/~p450srv/
Drug Adverse Reaction Target Database (DART)	ADR	http://xin.cz3.nus.edu.sg/group/dart/dart.asp
Endogenous G-Protein-Coupled Receptor List	TT, ADR	http://www.tumor-gene.org/gpcr/gpcr.html
GRAP Mutant Databases	TT, ADR	http://tinygrap.uit.no/grap/homepage.html
G Protein-Coupled page of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	TT, ADR	http://www.genome.ad.jp/kegg/ortholog/tab04030.html
Glutamate Receptor Research	TT, ADR	http://www.bris.ac.uk/synaptic/info/tools.html
HIV Protease Database	TT	http://srdata.nist.gov/hivdb/

База данных	Тип белка	URL
Human Intestinal Transport System	ADME	http://bigfoot.med.unc.edu/watkinslab
Human Membrane Transporter Database (HMTD)	ADR, ADME	http://laboratory.digibench.net/transporter/
Human Olfactory Receptor Data Exploratorium (HORDE)	TT, ADR	http://bioinfo.weizmann.ac.il/horde/
Human P450 database	ADR, ADME	http://www.gentest.com/human_p450_database/
Information System for G-Protein-Coupled Receptors (GPCRDB)	TT, ADR	http://www.gpcr.org/7tm/
Information System for Nuclear Receptors (NuclearRDB)	TT	http://receptors.ucsf.edu/nr/
Ion Channel Network (ICN)	TT	http://www.pain.med.umn.edu/csn/
Ligand-gated Ion Channel Database (LGIC)	TT	http://www.pasteur.fr/recherche/banques/lgic/lgic.html
Mendelian Inheritance and the Mitochondrion (MitoDat) database	ADR	http://www-lecb.ncifcrf.gov/mitodat/
MEROPS, the Proteases Databases	TT	http://www.merops.ac.uk/merops/merops.htm
Mitochondria Project database (MITOP)	ADR	http://www.mips.biochem.mpg.de/proj/medgen/mitop/
Nuclear Protein Database (NPD)	TT	http://npd.hgu.mrc.ac.uk/
Nuclear Receptor Resource (NRR)	TT	http://bc.georgetown.edu/nrr/nrr.html
Nuclear Receptors database (NuReBase)	TT	http://www.ens-lyon.fr/lbmc/laudet/nurebase/access/access.html
Nuclear Receptors page on CDDb	TT	http://mrbl.mddk.nih.gov/cdddb/display.php?section=16
Olfactory Receptor DataBase (ORDB)	TT	http://senselab.med.yale.edu/senselab/ordb/default.asp

База данных	Тип белка	URL
Peptaibol Database	TT	http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol
Phosphodiesterases Page of the Collecting Duct Database	TT	http://mrh.niddk.nih.gov/cddb/
Phosphoprotein Database (PPDB)	TT	http://www.lecb.ncicrf.gov/phosphodb/
PhosphoBase	TT	http://www.cbs.dtu.dk/databases/phosphobase/
PROLYSIS (Protease database)	TT	http://delphi.phys.univ-tours.fr/prolysis/
Protease/ExPASy	TT	http://www.expasy.org/cgi-bin/lists7peptidas.txt
Proteases of E. coli	TT	http://www.cj.ac.uk/biosi/staff/ehrmann/tools/proteases.index.html
Protein Kinase Resource (PKR)	TT, ADR	http://pkr.sdsc.edu/html/index.shtml
Proteinase Inhibitor Database	TT	http://www.ysbl.york.ac.uk/~proteinase/
Receptor Database	TT, ADR	http://impact.nihs.go.jp/rdb.html
SEVENS database (7-Transmembrane helix proteins database)	TT, ADR	http://sevens.cbrc.jp/
Serine proteases	TT	http://biochem.wustl.edu/~protease/ser_pro_link.html
Therapeutic Target Database (TTD)	TT	http://xin.cz3.nus.edu.sg/group/ttd/ttd.asp
Transporter Page of University Hospital Groningen	ADR, ADME	http://www.med.rug.nl/mdl/english/tab3.htm
Voltage-gated Potassium Channel Database (VICDB)	TT	http://vkcdb.biology.ualberta.ca/

Примечание: ADME — белки ассоциированные с процессами всасывания распределения, метаболизма и экскреции лекарств; ADR — белки, связанные с побочным действием лекарств; TT — биологические мишени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Даниэльс Ф., Олберти Р. Физическая химия. — М.: Мир, 1978. — 645 с.
2. Уильямс В., Уильямс Х. Физическая химия для биологов. — М.: Мир, 1976. — 600 с.
3. Чанг Р. Физическая химия с приложениями к биологическим системам. — М.: Мир, 1980. — 602 с.
4. Ленинджер А. Биохимия. — М.: Мир, 1974. — 957 с.
5. Клоту И. Энергетика биохимических реакций. — М.: Мир, 1970. — 352 с.
6. Крешков А. П. Основы аналитической химии. — Т. 1. — М.: Химия, 1970. — 471 с.
7. Иост Х. Физиология клетки. — М.: Мир, 1975. — 864 с.
8. Леви А., Сикевич Ф. Структура и функция клетки. — М.: Мир, 1971. — 583 с.
9. Eishenberg D., Kauzman W. The structure and properties of water. — Oxford Univ. Press, 1969. — 247 p.
10. Стародубцев Д. С. Органическая химия. — М.: Высшая школа, 1991. — 368 с.
11. Антонов В. Ф., Черныш А. М., Пасечник В. И. и др. Биофизика: Учеб. для студ. высш. учеб. заведений. — М.: Гуманит. изд. центр ВЛАДОС, 1999. — 299 с.
12. Smith R., Hansch C., Ames M. Selection of a reference partitioning system for drug designing work // J. Pharm. Sci. — 1975. — 64. — P. 599—606.
13. Scherer R., Howard S. Use of distribution coefficients in quantitative structure-activity relationships // J. Med. Chem. — 1977. — 20. — P. 53—58.
14. Мецлер Д. Биохимия. — Т. 1. — М.: Мир, 1980. — 407 с.
15. Наградова Н. К., Муронец В. И. Мультидоменная организация ферментов // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Биологическая химия. — Т. 38. — 1991. — С. 3—10.
16. Голиков С. Н., Кузнецов С. Г., Зацепин Э. П. Стереоспецифичность действия лекарственных средств. — Л.: Медицина, ленинградское отделение, 1973. — 184 с.
17. Кретович В. Л. Введение в энзимологию. — М.: Наука, 1967. — 352 с.
18. Гудман М., Морхауз Ф. Органические молекулы в действии. — М.: Мир, 1977. — 335 с.
19. Богатский А. В., Головенко Н. Я. Роль стереохимических факторов в метаболизме лекарственных средств // Вопросы стереохимии. — 1977. — 6. — С. 3—16.
20. Головенко Н. Я. Механизмы реакций метаболизма ксенобиотиков в биологических мембранах. — К.: Наук. думка, 1981. — 290 с.

21. Малер Г., Кордес Ю. Основы биологической химии. — М.: Мир, 1970. — 567 с.
22. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. — М.: Мир, 1980. — 432 с.
23. Уайт А., Хейдлер Ф., Смит Э. и др. Основы биохимии. — Т. 1. — М.: Мир, 1981. — 531 с.
24. Варфоломеев С. Д., Гуревич К. Г. Биокинетика: практ. курс. — М., 1999. — 720 с.
25. Башура Г. С., Оридорога В. А. Вспомогательные вещества и их роль в создании лекарственных форм // Технология и стандартизация лекарств, 1996. — С. 317—411.
26. Оболенцева Г. В., Чайка Л. А., Васильченко Е. А. Классификация лекарственных форм, их значение в медицине. Лекарственные формы нового поколения. Биофармацевтические аспекты // Технология и стандартизация лекарств, 1996. — С. 286—316.
27. Штейнгарт М. В., Казаринов Н. А. Твердые лекарственные формы // Технология и стандартизация лекарств, 1996. — С. 539—605.
28. Jackson K., Young D., Pauts S. Drug-excipient interactions and their affect on absorption // PSTT, 2000. — 3. — № 10. — P. 336—345.
29. Haojarern S. Comparative bioavailability of paziquantel tablets // DICP, 1989. — 23. — P. 29—32.
30. Lovering E., Mainville C. Correlations among dissolution, permeation and bioavailability of phenylbutazon formulations // Can. J. Pharm. Sci., 1977. — 12. — P. 48—50.
31. Concherio A. Dissolution rate and bioavailability of spironolactone tablets: effect of various technological factors // Drug Dev. Ind. Pharm., 1987. — 13. — P. 2301—2314.
32. Shargel L., Lu A. Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics (2nd edn). — Notwalk, CT, Appleton—Century—Crofts, 1985. — 420 p.
33. Nenvonen P. Bioavailability of phenotoin: clinical pharmacokinetic and therapeutic implication // Clin. Pharm., 1979. — 4. — P. 91—103.
34. Banker Y., Rhodes C. Modern pharmaceutics. — Marcel Dekker, 1996. — 450 p.
35. Уголев А. М., Колтушкина Г. Г. Мембранное пищеварение и ферментный аппарат микроворсинки // Структура и функции биологических мембран. — М.: Наука, 1975. — С. 276—306.
36. Зуфаров К. А. Значение мембранных структур клеток в процессах всасывания. — Там же, 1975. — С. 327—339.
37. Bennhold H., Ott H. Der stofftransport. — In.: Handbuch der allgemein pathologie. — Vol 1. — Berlin: Springer, 1961. — P. 166—275.
38. Wright E. Solute and water transport across epithelia // Am. Rev. Respir. Dis., 1983. — 127. — S3—S8.
39. Gumbiner B. Structure, biochemistry and assembly of epithelial tight junction // Am. J. Physiol., 1987. — 253. — P. 749—758.

40. Ясцо Кагава. Биомембраны. — М.: Высшая школа, 1985. — 303 с.
41. Архипенко В. И., Гербильский Л. В., Черченко Ю. П. Структура и функции межклеточных контактов // Структура и функции биологических мембран. — М.: Наука, 1975. — С. 76—95.
42. Diamond J. The epithelial junction: bridge, gate and fence // *Physiologist*, 1977. — 20. — P. 10—18.
43. Han van de Waterbeemd, Smith D., Beaumont K. Property-based design: optimization of drug absorption and pharmacokinetics // *J. Med. Chem.*, 2001. — 44. — № 9. — P. 1313—1333.
44. McAinsh J., Holmes B. Pharmacokinetic studies with atenolol in the dog. // *Biopharm. Drug Dispos*, 1983. — 4. — P. 249—261.
45. Bastain W., Boyce M., Stafford Z. et al. Pharmacokinetics of xamoterol after intravenous and oral administration to volunteers // *Eur. J. Clin. Pharm.* 1988. — 34. — P. 469—473.
46. Furuse M. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions // *J. Cell Biol.*, 1993. — 123 — P. 1777—1788.
47. Bamforth S. A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function // *J. Cell Sci.*, 1999. — 112. — P. 1879—1888.
48. Ward P., Tippin T., Thaker D. Enhancing paracellular permeability by modulating epithelial tight junctions // *PSTT*, 2000. — 3. — № 10. — P. 346—355.
49. Tsukita S., Furuse M. Occludin and claudins in tight junction strands: leading or supporting players? // *Trends Cell Biol.*, 1999. — 9. — P. 268—273.
50. Stevenson B. Identification of ZO-1; a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia // *J. Cell Biol.*, 1986. — 103. — P. 755—766.
51. Ferraris R., Diamond J. Regulation of intestinal sugar transport // *Physiol. Rev.*, 1997. — 77. — P. 257—303.
52. Костюк П. Т., Зима В. Л., Магура І. С. та інші. Біофізика. — К.: Обереги, 2001. — 544 с.
53. Bjarnason J. Intestinal permeability // *Gut*. — 1994. — 35. — P. 18—22.
54. Лоуренс Д., Бенитт П. Клиническая фармакология. — М.: Медицина, 1993. — Т. 1. — 320 с.
55. Lee Y., Dallas S., Hong M. Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma considerations // *Pharmacol. Rev.*, 2001. — 53. — № 4. — P. 569—596.
56. Zhang Z., Brett C., Giacomini K. Role of organic cation transporters in drug absorption and elimination // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1998. — 38. — P. 431—460.
57. Zhang Z., Dresser M., Gray A. et al. Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter // *Mol. Pharmacol*, 1997. — 51. — P. 913—921.
58. Suzuki H., Sawada Y., Sugiyama Y. et al. Transport of cimetidine by the rat choroid plexus *in vitro* // *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 1986. — 239. — P. 927—935.

59. *Sekine T., Cha S., Endon H.* The multi specific organic anion transporter (OAT) family // *Pflügers Arch.*, 2000. — 89. — P. 337—344.
60. *Kakyo M., Unno M., Tokui T. et al.* Molecular characterization and functional regulation of a novel rat liver-specific organic anion transporter rlst-1 // *Gastroenterology*, 1999. — 117. — P. 770—775.
61. *Kakyo M., Sakagami H., Nishio T. et al.* Immunohistochemical distribution and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide 2 (Oatp2) // *FEBS Lett.*, 1999. — 445. — P. 343—346.
62. *Cass C., Young J., Baldwins S.* Recent advances in the molecular biology of nucleoside transporters of mammalian cells // *Cell. Biol.*, 1998. — 76. — P. 761—770.
63. *Plagemann P., Wohlhueter R., Woffendin C.* Nucleoside and nucleobase transport in animal cells // *Biochim. Biophys. Acta*, 1988. — 947. — P. 405—443.
64. *Cass C.* Nucleoside transport. — In: *Drug transport in antimicrobial and anticancer chemotherapy.* — Marcel Dekker, N. Y., 1995. — P. 403—451.
65. *Sharom F.* the P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs? // *J. Membr. Biol.*, 1997. — 160. — P. 161—175.
66. *Biedler J., Riehm H.* Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells *in vitro*: cross-resistance, radioautographic and cytogenetic studies // *Cancer. Res.*, 1970. — 30. — P. 1174—1184.
67. *Fardel O., Lecureur V., Guillouzo A.* The P-glycoprotein multidrug transporter // *Gen. Pharmacol.*, 1996. — 27. — P. 1283—1291.
68. *Borst P., Evers R., Kool M., et al.* A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins // *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000. — 92. — P. 1295—1302.
69. *Головенко Н. Я.* Молекулярные аспекты взаимодействия сывороточного альбумина с лекарствами и его фармакологические последствия // *Мол. биология*, 1978. — Вып. 20. — С. 22—32.
70. *Carter D., Ho J.* Structure of serum albumin // *Adv. Protein Chem.*, 1994. — 45. — P. 152—203.
71. *Herve F., Urien S., Allbengres E. et al.* A summary of recent trends in the study of drug and hormone binding // *Clin. Pharmacokinet.*, 1994. — 26. — P. 44—58.
72. *Геннис Р.* Биомембраны. Молекулярная структура и функции. — М.: Мир, 1997. — 622 с.
73. *Викторов А. П., Передерий В. Г., Щербак А. В.* Взаимодействие лекарств и пищи. — К.: Здоровье, 1991. — 240 с.
74. *Парк Д. В.* Биохимия чужеродных соединений. — М.: Медицина, 1973. — 288 с.
75. *Соловьев В. Н., Фирсов А. А., Филов В. А.* Фармакокинетика. — М.: Медицина, 1980. — 423 с.
76. *Губина Т. Н., Ковалев И. П.* Трансдермальные терапевтические системы // *Технология и стандартизация лекарств.* — Харьков, 1996. — С. 749—777.

77. Кравченко И. А. Трансдермальное введение лекарственных препаратов. — Одесса, Астропринт, 2001. — 166 с.
78. Башура Г. С., Башура А. Г. Аэрозоли // Технология и стандартизация лекарств. — Харьков, 1996. — С. 699—731.
79. Benford D., Bridges J. Xenobiotic metabolism in lung. In: Progress in drug metabolism. — London, Taylor and Francis, 1986. — P. 53—94.
80. Кукес В. Г., Фисенко В. П., Стародубцев А. К. и др. Метаболизм лекарственных препаратов. — М.: Палей-М, 2001. — 109 с.
81. Lown K., Ghosh M., Watkins P. Sequences of intestinal and hepatic cytochrome P450 3A4 cDNAs are identical // Drug Metab. Dispos., 1998. — 26. — P. 185—187.
82. Головенко Н. Я. Уридиндифосфатглюкуронилтрансфераза. Структура и каталитические свойства // Успехи соврем. биологии, 1980. — 89. — № 3. — С. 360—376.
83. Головенко Н. Я. Метаболизм ксенобиотиков кишечной микрофлорой // Успехи соврем. биологии, 1977. — 84. — № 3. — С. 429—440.
84. Головенко Н. Я., Карасева Т. Л. Сравнительная биохимия чужеродных соединений. — К.: Наук. Думка, 1983. — 200 с.
85. Фирсов А. А., Пиотровский В. К. Фармакокинетические методы в биофармации: оценка биодоступности и пресистемная элиминация лекарственных средств // Итоги науки и техники, сер. Фармакология. Химиотерапевтические средства. — 1984. — Т. 14. — С. 114—227.
86. Зиньковский В. Г., Жук О. В., Головенко М. Я. та інші. Фармакологічний аналіз рецепторно-лігандної взаємодії. — К.: Видавничий дім «Академперіодика», 2001. — 208 с.
87. Ковтун Л. І., Коваленко В. М., Ефімцева Т. К. та ін. Актуальність вивчення біоеквівалентності генеричних препаратів // Ліки, 2001. — № 1—2. — С. 51—59.
88. Фирсов А. А., Родионов А. П., Страгунский Л. С. и др. Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств (издание официальное). Часть 1. Фармакокинетические аспекты. — М., 1995. — 12 с.
89. Петков В. Лекарство, организм, фармакологический эффект. — София. Медицина и физкультура, 1974. — 350 с.
90. Foreman H. Translocation of drugs into bone. In: Concepts in biochemical pharmacology. Eds. Brodie B. B., Gillette J. R. — Berlin: Springer-Verlag, 1971. — P. 249—257.
91. Borchard R., Smith P., Wilson G. (Eds) Models for assessing drug absorption and metabolism. — N. Y., Plenum Press. — 420 p.
92. Андронати С. А., Зиньковский В. Г., Головенко Н. Я. и др. Сравнительная биокинетика нового пролекарственного препарата и его метаболита // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 1992. — № 1. — С. 45—47.
93. Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г., Якубовская Л. Н. Синтез меченых радиоактивными изотопами производных 1,4-бенздиазепина и установление структуры их метаболитов // Украинский химический журнал, 1999. — Т. 65. — № 9. — С. 34—44.

94. Штерн Л. С. Проблемы гисто-гематических барьеров. — М., 1965. — 253 с.
95. Кассиль Л. Н. Гемато-энцефалический барьер. — М.: Медицина, 1963. — 357 с.
96. Аляутдин Р. Н. Молекулярные механизмы направленного транспорта лекарственных веществ в мозг // Российский мед. журнал, 2001. — № 2. — С. 3—7.
97. Padridge W. Drug delivery to the brain // J. Cereb. Blood Flow Metab., 1997. — 17. — P. 713—731.
98. Padridge W. Blood-brain barrier biology and methology // J. Neurovirol. — 1999. — 5. — P. 556—559.
99. Lamanan R., Schanker L. Transport of choline out of the cranial cerebrospinal fluid spaces of the rabbit // J. Pharmacol. Exp. Ther., 1980. — 215. — P. 563—568.
100. Broadwell R. Transcytosis of macromolecules through the blood-brain barrier: a cell biological perspective and critical appraisal // Acta Neuropathol., 1989. — 79. — P. 117—128.
101. Spector R., Johanson C. The mammalian choroid plexus // Sci. Am., 1989. — 261. — P. 68—74.
102. Hong M., Schlichter Z., Bendayan R. A novel zidovudine uptake system in microglia // J. Pharmacol. Exp. Ther., 2001. — 296. — P. 141—149.
103. Lee Y., Schlichter Z., Bendayan R. Functional expression of P-glicoprotein in rat brain microglia // Ibid. — 2001. — 299. — P. 204—212.
104. Вельш У., Шморх Ф. Введение в цитологию и гистологию животных. — М.: Мир, 1976. — 260 с.
105. Walz W. Controversy surrounding the existence of discrete functional classes of astrocytes in adult gray matter // Glia, 2002. — 31. — P. 95—103.
106. Spector R. Drug transport in the central nervous system: role of carriers // Pharmacology, 1990. — 40. — P. 1—7.
107. Verkhratsky A., Steinhauser C. Ion channels in glial cell // Brain Res. Brain Res. Rev., 2000. — 32. — P. 380—412.
108. Bush A., Karbach U., Miska D., et al. Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine and memantine // Mol. Pharmacol., 1998. — 54. — P. 342—352.
109. Eder C. Ion channels in microglia (brain macrophages) // Am. J. Physiol., 1998. — 275. — P. 327—342.
110. Wu X., Kekuda R., Huang W., et al. Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake) and evidence for the expression of the transporter in brain // J. Biol. Chem., 1998. — 273. — P. 32776—32786.
111. Gu J., Nath A., Geiger J. Characterization of inhibitor-sensitive and resistant adenosine transporters in cultured human fetal astrocytes // J. Neurochem., 1996. — 67. — P. 972—977.

112. *Sinclair C., La Riviere C., Young J., et al.* Purine uptake and release in rat C6 glioma cells: nucleoside transport and purine metabolism under ATP-dependent conditions // *J. Neurochem.*, 2000. — 75. — P. 1528—1538.
113. *Nishino J., Suzuki H., Sugiyama H., et al.* Transepithelial transport of organic anions across the choroid plexus: possible involvement of organic anion transporter and multidrug resistance associated protein // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1999. — 290. — P. 258—289.
114. *Zhang Y., Han H., Elmquist W.* Expression of various multidrug resistance-associated protein (MRP) homologues in brain microvessel endothelial cells // *Brain Res.*, 2000. — 876. — P. 148—153.
115. *Begley D., Lechardeur D., Chen L., et al.* Functional expression of P-glycoprotein in an immortalized cell line of rat brain endothelial cells. RBE4 // *J. Neurochem.*, 1996. — 67. — P. 988—995.
116. *Рябухин И. А., Дмитриева Т. Б., Чехонин В. П.* Гематоэнцефалический барьер. Часть 1 (эмбриоморфогенез, клеточная и субклеточная биология плотных контактов эндотелиоцитов) // *Нейрохимия* — 2003. — 20. — № 1. — С. 12—23.
117. *Нуритдинов В. А.* Проницаемость гемато-офтальмического барьера и гидродинамика глаз // *Вестник офтальмологии*, 1971. — № 5. — С. 30—37.
118. *Yoshida F., Topliss J.* Unified model for the corneal permeability of related and diverse compounds with respect to their physicochemical properties // *J. Pharm. Sci.*, 1996. — 85. — P. 819—823.
119. *Schwartzman M., Balazy M., Masferrer J., et al.* 12(R)-hydroxyicosatetraenoic acid: a cytochrome P450-dependent arachidonate metabolite that inhibits Na^+ , K^+ -ATPase in the cornea // *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1987. — 84. — P. 125—129.
120. *Finster M., Mark L. C.* Placental transfer of drugs and their distribution in fetal tissues. In: *Concepts in biochemical pharmacology*. Eds. Brodie B. B., Gillette J. R. — Berlin: Springer-Verlag, 1971. — P. 276—285.
121. *Ruedy J.* The concentration of penicillins in the cerebrospinal fluid and brain of rabbits with experimental meningitis // *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, 1965. — 43. — P. 763—772.
122. *Кивман Г. Я., Смольникова Н. М.* Взаимодействие тетрациклина с компонентами клеток печени крыс // *Антибиотики*, 1966, 3. — С. 229—233.
123. *Богатский А. В., Головенко Н. Я., Карасева Т. Л.* Распределение нитразепама и его метаболитов в субклеточных фракциях некоторых органов белых крыс // *Вопр. мед. химии*, 1977. — № 1. — С. 92—96.
124. *Головенко Н. Я., Карасева Т. Л., Курушин А. Н.* Ацетилирование 7-аминопроизводного нитразепама субклеточными фракциями некоторых органов и кровью белых крыс // *Там же*, 1978. — № 6 — С. 839—845.
125. *Головенко Н. Я., Метешкин Ю. В., Якубовская Л. Н.* Исследование каталитических свойств монооксигеназ, окисляющих ^{14}C -феназепам // *Там же*, 1980. — № 5. — С. 637—640.

126. Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г., Жук О. В. Факторы, изменяющие метаболизм и распределение феназепама в субклеточных фракциях гепатоцитов животных // Там же, 1984. — № 4. — С. 67—71.
127. Пиотровский В. К. Метод статистических моментов и интегральные модельно-независимые параметры фармакокинетики // Фармакол. и токсикол. — 1986 — № 5. — С. 118—127.
128. Головенко М. Я. Фармакокінетика лікарських засобів. В кн.: Наукові основи розробки лікарських препаратів. — Харків: Основа, 1998. — С. 435—443.
129. Головенко М. Я. Ксенобіохімія — новий ступінь пізнання природи // Вісн. АН УССР. — 1985. — № 6. — С. 24—33.
130. Garfinkel D. Studies on pig liver microsomes // Arch. Biochem. and Biophys. — 1958. — 77, № 3. — P. 493—509.
131. Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes // Ibid. — 1958. — 75, № 2. — P. 376—386.
132. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М.: Наука, 1975. — 327 с.
133. Головенко Н. Я., Галкин Б. Н. Цитохром P450 зависимый путь окисления арахидоновой кислоты и ее метаболитов // Укр. биохим. ж. — 1985. — Т. 58. — № 2. — С. 104—116.
134. Головенко Н. Я., Галкин Б. Н. Биохимические механизмы простагландин-синтеза окисления ксенобиотиков // Вопр. мед. хим. — 1986. — Т. 32. — № 3. — С. 9—16.
135. Ahrqwal A., Shapiro B. Phenobarbital induction of hepatic CYP2B1 and CYP2B2 pretranscriptional and posttranscriptional effects of gender, adult age and phenobarbital dose // Mol. Pharmacol. — 1996. — 49, № 3. — P. 523—531.
136. Ioannides C., Parke D. V. The cytochrome P450. Gene family of microsomal hemoproteins and their role in the metabolic activation on chemicals // Drug Metab. Rev. — 1990. — V. 27, № 1. — P. 1—85.
137. Lin I., Lu A. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development // Pharm. Revs. 1997. — № 4. — P. 403—449.
138. Muford C. A., Kedderis G. Z. Sex-dependent metabolism of xenobiotics // Drug Metab. Rev. — 1998. — V. 30, № 3. — P. 441—498.
139. Levis D. Cytochrome P450: structure, function and mechanism: — Taylor and Francis, 1996. — 450 p.
140. Nelson D., Koymans Z., Kamataki T., et al. P450 superfamily: update on new sequence, gene mapping, accession numbers and nomenclature // Pharmacogenetics. — 1996. — № 6. — P. 1—42.
141. Головенко Н. Я. Некоторые аспекты биохимии, химии, молекулярной биологии и генетики цитохрома P450 // Современ. пробл. токсикологии. — 2001. — № 3. — С. 17—23.
142. Nebert D. W., Gonzales F. J. P450 genes: Structure, evolution and regulation // Annu. Rev. Biochem. — 1987. — 56, № 3. — P. 572—593.
143. Nelson D., Strobel H. Evolution of cytochrome P450 proteins // Mol. Biol. Evol. 1987. — 4, № 2. — P. 572—593.

144. Archakov A., Zisitsa A., Zgoda V. *et al.* Censterization of P450 superfamily using the objective pair alignment method and UPGMA program // J. Mol. Model. — 1998. — № 4. — P. 153—158.

145. Nelson D., Kamataki T., Waxman D., *et al.* The P450 superfamily: update on new sequence, gene mapping, accession numbers, early trivial names, and nomenclature // DNA Cell Biol. — 1993. — 12, № 1. — P. 1—15.

146. Juchau M., Boutelet-Bochan H., Huang Y. Cytochrome P450-dependent biotransformation of xenobiotics in human and rodent embryonic tissues // Drug Metab. Rev. — 1998. — 30, № 3. — P. 541—568.

147. Guengerich F. P. Characterization of human cytochrome P450 enzymes // FASEB J. — 1992. — 6. — № 2. — P. 745—748.

148. Nakajama T., Yamamoto T., Nunoya K., *et al.* Role of human cytochrome P4502A6 in C-oxidation of nicotine // Drug metab. Dispos. — 1996. — 24. — № 11. — P. 1212—1217.

149. Frueh F. W., Zauger U. M., Meyer U. A. Extend and character of phenobarbital-mediated changes in gene expression in the liver // Mol. pharmacol. — 1997. — 51. — № 3. — P. 363—369.

150. Levy R. H. Cytochrome P450 isoenzymes and antiepileptic drug interactions // Epilepsia. — 1995. — 36. — Suppl. 5. — P. 8—13.

151. Sadrieh N., Synderwine E. G. Cytochromes P450 in cynomolgus monkeys mutagenically activate 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) but not 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) // Carcinogen. — 1995. — 16. — № 7. — P. 1549—1555.

152. Funck-Brentano C., Becquemont L., Leneuve A., *et al.* Inhibition by omeprazole of proguanil metabolism: mechanism of the interaction *in vitro* and prediction of *in vivo* results from the *in vitro* experiments // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1997. — 280. — № 2. — P. 730—738.

153. Kroemer H. K., Eichelbaum M. «It's the genes, stupid». Molecular bases and clinical consequences of genetic cytochrome P4502D6 polymorphism // Life Sciences. — 1995. — 56. — № 26. — P. 2285—2298.

154. Rodrigues A. D., Roberts E. M. The *in vitro* interaction of dexmedetomidine with human liver microsomal cytochrome P4502D6 (CYP2D6) // Drug Metab. Dispos. — 1997. — 25. — № 5. — P. 651—655.

155. Albano E., Comoglio A., Clot P., *et al.* Activation of alkylhydrazines to free radical intermediates by ethanol-inducible cytochrome P4502E1 (CYP2E1) // Biochim. Biophys. Acta. — 1995. — 1243. — № 3. — P. 414—420.

156. Longo V., Menicagli S., Minks M. *et al.* Purification and characterization of hepatic P450IIE1 from acetone-treated mice // Toxicol. Ind. Health. — 1993. — 9. — № 3. — P. 539—546.

157. Effect of fasting and obesity in humans on the 6-hydroxylation of chlorzoxazone: a putative probe of CYP2E1 activity / O'Shea D., Davis S. N., Kim R., Wilkinson G. // Clin. Pharmacol. Ther. — 1994. — 56. — № 4. — P. 359—367.

158. Woolf T. Handbook of drug metabolism. — Marcel Dekker, 1999. — 596 p.

159. *Periti P., Mazzei T., Mini E.* Pharmacokinetic drug interactions of macrolides // Clin. Pharmacokinet. — 1992. — 23. — P. 106—131.
160. *A single amino acid substitution (leu160his) in cytochrome P450 CYP2A6 causes switching from 7-hydroxylation to 3-hydroxylation of coumarin* / Hadidi H., Zahlsen K., Idle J., Cholerton S. // Food Chem. Toxicol. — 1997. — 35. — P. 903—907.
161. *Метелица Д. И.* Моделирование окислительно-восстановительных ферментов. — Минск: Наука и техника, 1984. — 293 с.
162. *Фридович И.* Радикалы кислорода, пероксид водорода и токсичность кислорода. — В кн.: Свободные радикалы в биологии. — Т. 1. — М.: Мир, 1979.
163. *Саундерс Б.* Пероксидазы и каталазы // Неорганическая биохимия. — Т. 2. — М.: Мир, 1978. — С. 434—470.
164. *Wilkinson C. F., Murray M., Markus C.* Interaction of methylenedioxyphenyl compounds with cytochrome P450 and effects on microsomal oxidation. — In: Reviews in biochem., 1984, 6. — P. 27—63.
165. *Schonbaum Y., Chance B.* Katalase // The enzymes. — New York, Acad. Press, 1975. — P. 363—408.
166. *Лукьянова Л. Д., Балмухамедов Б. С., Уголев А. Т.* Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние. — М.: Наука, 1982. — 856 с.
167. *Голиков С. Н., Саноцкий И. В., Тиунов Л. А.* Общие механизмы токсического действия. — М.: Медицина, 1986. — 280 с.
168. *Castro C. E.* Mechanisms of reaction of hemoproteins with oxygen and hydrogen peroxide in the oxidation of organic substrates // Pharmacol. Ther. — 1980, 10. — P. 171—189.
169. *Studies on aspirin esterase of human serum* / Morikawa M., Inone M., Tsuboi M., Sugiura M. // Jap. J. Pharmacol. — 1979. — 29. — P. 581—586.
170. *Головенко Н. Я.* Ферментные свойства миоглобина и гемоглобина // Достижения биології та медицини. — 2003. — № 1. — С. 11—15.
171. *Esclade Z., Guillochon D., Thomas D.* Aromatic hydroxylation in peroxidation by haemoglobin systems // Xenobiotica, 1986, 7. — P. 615—624.
172. *Метелица Д. И., Еремин А. Н., Головенко Н. Я. и др.* Тетрафенилпорфирин железа (III) в обращенных мицеллах поверхностно-активных веществ — модель пероксидазы // Кинетика и катализ. — 1987. — 28, № 6. — С. 1315—1322.
173. *Метелица Д. И., Еремин А. Н., Головенко Н. Я. и др.* Окисление ароматических аминов перекисью водорода при участии металлотетрафенилпорфиринов // Вести Академии наук БССР. Сер. Химических наук. — 1989. — № 1. — С. 58—64.
174. *Mieyal J. J.* Monooxygenase activity of hemoglobin and myoglobin. In.: Reviews in biochemical toxicology. — New York, Elsevier. — 1985. — № 7. — P. 1—66.
175. *Tyce G. M., Sharpless N. S., Owen C. A.* Demethylation in erythrocytes: A reaction involving hemoglobin // Amer. J. Physiol. — 1978. — 235. — P. 150—172.

176. Sies H., Wendelm A., Bors W. Metabolism of organic hydroperoxides. In.: Metabolic basis of detoxication. — New York, Academic Press. — 1982. — P. 307—322.

177. Sies H., Wendelm A., Bors W. Metabolism of organic hydroperoxides. In.: Metabolic basis of detoxication. Metabolism of functional groups. — New York, Academic Press. — 1982. — P. 307—322.

178. Terao J., Matsushita S. Products formed by photosensitized oxidation of unsaturated fatty acid esters // J. Amer. Oil. Chem. — 1977, 54. — P. 234—238.

179. Grosch W. Abbau von zinol — und zinolensanrehydroperoxyden in Gegenwart von Ascorbinsäure // Z. Lebensm. Unters. Forch. — 1977, 163. — P. 4—7.

180. Vane J. R. Prostacyclin: a hormone with therapeutic potential // J. Edocr., — 1982. — 85, № 2. — P. 3—43.

181. Nugteren D. H., Buytenhen M., Christ-Hazelhof E., et al. Enzymes involved in the conversion of endoperoxides // Progress in lipid research. — 1982. — 20, № 2. — P. 169—172.

182. Marnett L. J., Panthananickal A., Reed Y. Metabolic activation of 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]-perene during prostaglandin biosynthesis // Drug metabolism Rev. — 1982. — 13, № 2. — P. 235—247.

183. Prostaglandin synthetase-dependent cooxygenation / Marnett L., Bienkowski M., Luthauser M., Pagels W. // Prostaglandins and Cancer. — Washington, 1978. — 320 p.

184. Marnett L., Reed Y., Dennison D. Prostaglandin synthetase-dependent activation of 7,8-dihydro-7,8-dihydroxybenzo(a)pyrene to mutagenic derivatives // Biochem. and Biophys. Res. Comun. — 1978. — 82, № 1. — P. 210—216.

185. Boyd J., Barrnett J., Eling T. Prostaglandin endoperoxide synthetase-dependent cooxidation of (\pm)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene in C34/10 1/2 clone 8 cells // Cancer Res., — 1982. — 42, № 7. — P. 2628—2632.

186. Prostaglandin synthetase catalyzed activation of paracetamol / Moldens P., Anderson B., Rahimtula A., Bergren M. // Biochem. Pharmacol. — 1982. — 31, № 7. — P. 1363—1368.

187. Metabolism of N-alkyl compounds during the biosynthesis of prostaglandins. N-deakylation during prostaglandin biosynthesis / Sivarajah K., Lasker J. M., Eling T., Abon-Donia M. B. // Mol. Pharmacol. — 1982. — 21, № 1. — P. 133—141.

188. Cooxidation of steroidal and nonsteroidal estrogens by purified prostaglandin synthase results in a stimulation of prostaglandin formation / Degen Y. M., McLachlan S. A., Elin T. E., Sivarajah K. // J. Steroid. Biochem. — 1987, 26. — № 6. — P. 679—685.

189. Reed Y. A. Peroxidative oxidation of bilirubin during prostaglandin biosynthesis // Prostaglandins — 1985. — 30, № 1. — P. 153—165.

190. Tait G. The biosynthesis and degradation of heme. — In.: Handbook of experimental pharmacology. V: 44. Heme and hemoproteins. — Berlin: Springer-Verlag. — 1978. — P. 1—48.

191. Галкин Б. Н., Головенко Н. Я., Стефанская О. Н. и др. Активность цитохром Р450 зависимых ферментов печени крыс при введении ТФП-Fe³⁺ // Докл. АН УССР. Сер. «Б». — 1985. — № 11. — С. 77—80.
192. Галкин Б. Н., Ершова О. Н., Головенко Н. Я. и др. Ингибирование цитохром Р450 зависимых ферментов микросом печени крыс тетрафенилпорфирином // Вопр. мед. хим. — 1988. — 34, № 5. — С. 91—93.
193. Галкин Б. Н., Головенко Н. Я., Филиппова Т. О. и др. Индукция тетрафенилпорфирином Sn⁴⁺ цитохрома Р450 // Бюл. эксп. биол. и мед. — 1989, 107. — № 3. — С. 291—294.
194. Maines M. Panahian. The heme oxygenase system and cellular defense mechanisms. Do HO-1 and HO-2 have different functions // Adv. Exp. Med. Biol. — 2001, 502. — P. 249—272.
195. Wagoner F., Volk H. D., Willis D. et al. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation // Pharmacol. Rev. — 2003, 55. — P. 551—571.
196. Kikuchi Y., Yoshida T. Function and induction of the microsomal heme oxygenase // Mol. and Cell. Biochem. — 1983, 53—54, 1—2. — P. 163—183.
197. Tenhunen R., Marver H. S., Schmid R. The enzymatic catabolism of hemoglobin: Stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin // J. Lab. Clin. Med. — 1970, 75, 3. — P. 410—421.
198. Schacter B. A., Waterman M. R. Activity of various metalloporphyrin protein complexes with microsomal heme oxygenase // Life Sci. — 1974, 14, 1. — P. 47—54.
199. Philippova T., Galkin B., Golovenko N., et al. The protective properties of synthetic porphyrin tin complexes in toxic hyperbilirubinemia // J. Porphyrins Phtalocyanines. — 1999, 3. — P. 1—5.
200. Ziegler D. M. Flavin-containing monooxygenases: Catalytic mechanism and substrate specificities // Drug Metab. Revs. — 1988, 2. — P. 1—32.
201. Rettie A., Fisher M. Transformation enzymes: oxidative; non-P450. — In.: Handbook of drug metabolism. — New York, Marcel Dekker. — 1999. — P. 131—151.
202. Burnett V. L., Lawton M. P., and Philpot R. M. Cloning and sequencing of flavin-containing monooxygenases FMO3 and FMO4 from rabbit and characterization of FMO3 // J. Biol. Chem. — 1994, 269. — P. 14314—14320.
203. Dolphin C. T., Cullingford T. E., Shephard E. A., et al. Differential development and tissue-specific regulation of the genes encoding three members of the flavin-containing monooxygenase family of man // Eur. J. Biochem. — 1996, 235. — P. 683—691.
204. Lee M. Y., Smiley S., Kadkhodyan S., et al. Developmental regulation of flavin-containing monooxygenase (FMO) isoforms 1 and 2 in pregnant rabbit // Chem. Biol. Interact. — 1995, 75. — P. 96—102.
205. Falls J. G., Ryu D. Y., Cao Y., et al. Regulation of mouse liver flavin-containing monooxygenases 1 and 3 by sex steroids // Arch. Biochem. Biophys. — 1997, 212. — P. 342—350.

206. *Lin J., Berkman C. E., Cashman J. R.* N-Oxygenation of primary amines and hydroxyl-amines and retroreduction of hydroxylamines by adult human liver microsomes and adult human flavin-containing monooxygenase 3 // *Chem. Res. Toxicol.* — 1996, 9. — P. 1183—1189.
207. *Damani L. A.* The flavin-containing monooxygenase as an amine oxidase. — In.: *Metabolism of xenobiotics.* — London, Taylor and Francis. — 1988. — P. 59—70.
208. *Zindeke B., Cho A.* N-dealkylation and deamination. — In.: *Metabolic basis of detoxication.* Ed. *Jakoby W.* London, Academic Press. — 1982. — P. 105—126.
209. *Hadyson E., Levi P.* The flavin-containing monooxygenase as a sulfur oxidase. — In.: *Metabolism of xenobiotics,* Ed: *Gorrod J. W.* London, Taylor and Francis. — 1988. — P. 81—88.
210. *Ziegler D. M.* Recent studies on structure and function of multisubstrate flavin-containing monooxygenases // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 1993, 33. — P. 179—194.
211. *Kawaji A., Ohara K., Takabatake E.* An assay of flavin-containing monooxygenase activity with benzydamine N-oxidation // *Anal. Biochem.* — 1993, 214. — P. 409—415.
212. *McManus M., Stupans I., Burgess W. et al.* Flavin-containing monooxygenase activity in human liver microsomes // *Drug Metab. Dispos.* — 1987, 15. — P. 256—261.
213. *Guo Z. Y., Raeissi S., White R. B. et al.* Orphenadrine and methimazole inhibit cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes // *Ibid.* — 1997, 25. — P. 390—395.
214. *Itagaki K., Carver G. T., Philpot R. M.* Expression and characterization of a modified flavin-containing monooxygenase 4 from humans // *J. Biol. Chem.* — 1996, 271. — P. 20102—20108.
215. *Grothusen A., Hardt J., Brautigam L., et al.* A convenient method to discriminate between cytochrome P450 enzymes and flavin-containing monooxygenases in human liver microsomes // *Arch. Toxicol.* — 1996, 71. — P. 64—72.
216. *Ганелин В. А., Львов Н. А.* Молибденсодержащие ферменты // *Успехи биологической химии.* — 1975. — Т. 16. — С. 68—88.
217. *Beedham C.* Molybdenum hydroxylases: Biological distribution and substrate-inhibitor specificity // *Prog. Med. Chem.* — 1987, 24. — P. 85—97.
218. *Ishida K., Amaya Y., Noda K. et al.* Cloning of the cDNA encoding human xanthine dehydrogenase (oxidase): Structure analysis of the protein and chromosomal location of the gene // *Gene.* — 1993, 133. — P. 279—287.
219. *Xu P., Huecksteadt T., Harrison R.* Molecular cloning tissue expression of human xanthine dehydrogenase // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1994, 199. — P. 998—1003.
220. *Gueriolini R., Szumlanski C., and Weinshilboum R.* Human liver xanthine oxidase: Nature and extent of individual variation // *Clin. Pharmacol. Ther.* — 1991, 50. — P. 663—670.

221. *Beedham C.* Molybdenum hydroxylases as drug-metabolizing enzymes // *Drug Metab. Revs.* — 1985, 16, 1—2. — P. 119—156.
222. *Rajagopalan K. V.* Xanthine oxidase and aldehyde oxidase. — In.: *Enzymatic basis of detoxication*, New York, Academic Press. — 1980. — P. 295—310.
223. *Pristos C. A., Gustafson D. L.* Xanthine dehydrogenase and its role in cancer chemotherapy // *Oncol. Res.* — 1994, 6. — P. 477—482.
224. *Shanmuganathan K., Koudriakova T., Nampalli S. et al.* Enhanced brain delivery of an anti-HIV nucleoside 2-F-ara-ddI by xanthine oxidase mediated biotransformation // *J. Med. Chem.* — 1994, 37. — P. 821—827.
225. *Beedham C., Critchley D., Rance D. J.* Substrate specificity of human liver aldehyde oxidase toward substituted quinazolines and phthalazines: A comparison with hepatic enzyme from guinea pig, rabbit, and baboon // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1995, 319. — P. 481.
226. *Beedham C., Bruce S. E., Critchley D. J. et al.* Species variation in hepatic aldehyde oxidase activity // *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* — 1987, 12. — P. 307—312.
227. *Hille R., Nishino T.* Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase // *FASEB.* — 1995, 9. — P. 995—1003.
228. *Beedham C., Peet C., Panoutsopoulos et al.* Role of aldehyde oxidase in biogenic amine metabolism // *Prog. Brain. Res.* — 1995, 106. — P. 345—352.
229. *Tomita S., Tsujita M., Ichikawa Y.* Retinal oxidase is identical to aldehyde oxidase // *FEBS Lett.* — 1993, 336. — P. 272—278.
230. *Robertson C., Gamange K.* Methadone: A inhibitor of rat liver aldehyde oxidase // *Biochem. Pharmacol.* — 1994, 47. — P. 584—590.
231. *Robertson C., Bland T.* Inhibition by SKF-525A of the aldehyde oxidase-mediated metabolism of the experimental antitumor agent acridine carboxamide // *Ibid.* — 1993, 45. — P. 2159—2164.
232. *Головенко Н. Я., Сурмак В. В., Гурман Э. Г.* Потребление феназепам крысами в зависимости от алкогольной мотивации // *Фармакол. и токсикол.* — 1988, № 6. — С. 90—92.
233. *Zhuk O., Zinkovsky V., Golovenko N.* The pharmacodynamics of anticonvulsant and subconvulsant effects of ethanol in CBA and C57BZ/6 mice // *Alcohol* — 2001, 23. — P. 23—28.
234. *Yin S.* Alcohol dehydrogenase: Enzymology and metabolism // *Alcohol. Suppl.* — 1994, 2. — P. 113—118.
235. *Julia P., Farres J., Pares X.* Characterization of three isoenzymes of rat alcohol dehydrogenase // *Eur. J. Biochem.* — 1987, 162. — P. 179—189.
236. *Maly I., Saase D.* Intraacinar profiles of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase activities in human liver // *Gastroenterology* — 1991, 101. — P. 1716—1723.
237. *Teschke R., Hasumura I., Lieber C.* Hepatic microsomal ethanoloxidizing system: solubilization, isolation and characterization // *Arch. Biochem. and Biophys.* — 1974, 163. — № 2. — P. 404—415.

238. *Kageura E., Toki S.* Guinea pig liver 3-hydroxyhexobarbital dehydrogenase // *J. Biol. Chem.* — 1975, 250. — № 13. — P. 5015—5019.
239. *Hutson D.* Mechanisms of biotransformation // *Foreign Comp. Metab. Mammals* — 1972, 2. — № 3. — P. 328—397.
240. Головенко Н. Я., Коломейченко Г. Ю., Богатский А. В. Прямое измерение окисления вторичных спиртов субклеточными фракциями гепатоцитов крыс // Докл. АН СССР. — 1979, 246. — № 1. — С. 223—225.
241. *Brenner R.* Metabolism of endogenous substrates by microsomes // *Drug Metab. Revs.* — 1977, 6. — № 2. — P. 155—212.
242. Головенко Н. Я., Богатский А. В., Коломейченко Г. Ю. и др. Дегидрирование тетрагидро-1,4-бенздиазепин-2-она в организме белых крыс // Докл. АН СССР. — 1978, 238. — № 4. — С. 977—980.
243. *Otvos L., Teguey Z., Vereczkey L. et al.* Metabolism of levototary 4,5-dihydrodiazepam in the rat // *Drug Metab. and Disposit. Biol. Fate Chem.* — 1978, 6. — № 3. — P. 213—217.
244. Головенко Н. Я., Коломейченко Г. Ю., Пономаренко В. В. Особенности дегидрирования тетрагидро-1,4-бенздиазепин-2-она // Биохимия. — 1979. — № 12. — С. 2053—2057.
245. Созинов В. А., Орлов В. М., Головенко Н. Я. и др. Особенности метаболизма гидрированного аналога феназепама в организме крыс // Хим. фарм. ж. — 1987. — № 5. — С. 523—528.
246. Созинов В. А., Середенин С. Б., Головенко Н. Я. Биотрансформация ¹⁴C-гидрированного аналога феназепама в организме крыс // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 1987. — № 5. — С. 581—583.
247. Головенко Н. Я., Созинов В. А., Руденко О. П. Распределение ¹⁴C-гидрированного аналога феназепама в некоторых органах и тканях мышей // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 1986. — № 3. — С. 327—329.
248. *Ambroziak W., Pietruszko R.* Metabolic role of aldehyde dehydrogenase // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 1993, 328. — P. 5—12.
249. Давиденко Т. И., Романовская И. И., Бондаренко Т. И. Ферментативное восстановление нитросоединений // Итоги науки и техники (ВИНИТИ). Серия биологическая химия. — 1990. — Т. 34. — 120 с.
250. *Hewick D.* Reductive metabolism of nitrogen-containing functional groups. In.: *Metabolic basis of detoxication.* — New York, Academic Press. — Alcohol, 1982. — P. 151—170.
251. *Wolpert M., Althaus J., Johns D.* Nitroreductase activity of mammalian liver aldehyde oxidase // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 1973, 185. — P. 202—213.
252. *Poirier L., Weisburger J.* Enzymic reduction of carcinogenic aromatic nitro compounds by rat and mouse liver fractions // *Biochem. Pharmacol.* — 1974, 23. — P. 661—669.
253. *Testa B., Jenner P.* Drug metabolism, chemical and biochemical aspects — New York, Dekker, 1976. — 500 p.
254. *Testa B., Jenner P.* The concept of regioselectivity in drug metabolism. // *J. Pharm. and Pharmacol.* — 1976, 28. — № 4. — P. 731—734.

255. *Kato R., Oshima T., Takanaka A.* Studies on mechanism of nitro reduction by rat liver // *Mol. Pharmacol.*, 1965, 5. — № 5. — P. 487—498.

256. *Mason R. P., Holtzman J. L.* The mechanism of microsomal and mitochondrial nitroreductase: Electron spin resonance evidence for nitroaromatic free radical intermediates // *Biochemistry*, 1975, 14. — № 8. — P. 1626—1632.

257. *Gillette J. B.* Reductive enzymes. — In.: *Handbook of experimental pharmacology*. Pt. 2. Concepts in biochemical pharmacology. — Berlin: Springer—Verlag, 1971. — P. 349—361.

258. *Mason R. R., Holtzman J. L.* The role of catalytic superoxide formation in the O₂ inhibition of nitroreductase // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* — 1975, 67, № 4. — P. 1267—1274.

259. *Головенко Н. Я., Богатский А. В., Орлюк Е. И. и др.* Метаболизм нитразепама в кишечнике белых крыс // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* — 1977, 84. — № 7. — С. 63—56.

260. *Mason R. P., Peterson F. J., Holtzman J. L.* The formation of an azo anion free radical metabolite the microsomal azo reduction of sulfanazo III // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* — 1977, 75, № 3. — P. 532—540.

261. *Hernandez P. H., Gillette J. R., Mazel R.* Studies on the mechanism of action of mammalian hepatic azoreductase // *Biochem. Pharmacol.* — 1967, 16. — № 10. — P. 1859—1875.

262. *Hernandez P. H., Mazel R., Gillette J. R.* Studies on the mechanism of action of mammalian hepatic azoreductase. II. The effect of phenobarbital and 3-methylcholantrene on carbon monoxide sensitive and insen sitive azoreductase activities // *Ibid.* — 1967, 16. — № 10. — P. 1877—1888.

263. *Fujita S., Peisach J.* Liver microsomal cytochrome P450 and azoreductase activity // *J. Biol. Chem.* — 1978, 253. — P. 4512—4513.

264. *Scheline R.* Metabolism of foreign compounds by gastrointestinal microorganisms // *Pharmacol. Rev.* — 1973, 25. — P. 451—523.

265. *Polonovsky M.* Sur les genalcaloides // *C. r. Seanc. Soc. Biol.* — 1926, 94. — № 1. — P. 145—147.

266. *Vaiser E. B.* Non-enzymatic reduction of trimethylamine oxide to trimethylamine dimethylamine and formaldehyde // *Can. J. Biochem. Physiol.* — 1956, 34. — № 8. — P. 1085—1090.

267. *Terayama H.* Aminoazo dye amino-N-oxide as a possible intermediate metabolite preceding N-demethylation and C-hydroxylation, as well as azo-dye protein binding // *Gann.* — 1963, 54. — № 2. — P. 195—204.

268. *Bickel M.* Pharmacology and biochemistry of N-oxides // *Pharmacol. Rev.* — 1969, 21. — P. 325—354.

269. *Kato R., Sugiura M.* The reduction of tertiary amine N-oxides by hepatic microsomes and mitochondria. — In.: *Biological oxidation nitrogen: Proc. 2nd Intern. Symp. London.* — 1977. Amsterdam etc. — 1978. — P. 461—470.

270. *Murray K., Chaykin S.* The reduction of nicotinamide-N-oxide by xánthine oxidase // *J. Biol. Chem.* — 1966, 241. — № 22. — P. 3468—3473.

271. *Rooseboom M., Comandeur J., Vermeulen N.* Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs // *Pharmacol. Revs.* — 2004, 56. — P. 53—102.

272. *Lu A., West S., Ryan D.* Characterization of partially purified cytochrome P450 and P448 from rat liver microsomes // *Drug Metab. and Disposit. Biol. Fate Chem.* — 1973, 1, № 1. — P. 29—38.

273. *Lu A., Strobel H., Coori M.* Hydroxylation of benzamphetamine and other drugs by solubilized form of cytochrome P450 from liver microsomes // *Biochem. and Biophys. Res Commun.* — 1969, 36. — № 4. — P. 545—551.

274. *Sawada H., Hara A.* Studies on metabolism of bromazepam. VI. Reduction of 2-(amino-5-brombenzoyl)pyridine, a metabolite bromazepam, in the rabbit, rat and guine pig. // *Drug Metab. and Disposit. Biol. Fate Chem.* — 1978, 6, № 3. — P. 205—212.

275. Evidence for the involvement of cytochrome P450 in reduction of benzo[a]pyrene 4,5-oxide by rat liver microsomes / *Kato R., Iwasaki K., Shiraga T., Noguchi H.* // *Biochem. and Biophys. Res Commun.* — 1976, 70. — № 3. — P. 681—687.

276. *Jenner P., Testa B.* Novel pathways in drug metabolism // *Xenobiotica*, 1978, 8, № 1. — P. 1—25.

277. *Paul B. B., Rubinstein D.* Metabolism of tetrachloride and chloroform by the rat // *J. Pharmacol.* — 1963, 141, № 1. — P. 141—148.

278. *Van Dyke R. A.* On the fate chloroform // *Anesthesiology* — 1969, 30. — № 2. — P. 257—261.

279. *Cohen E., Trudell J., Edmunds H. et al.* Urinary metabolites of halotane in man // *Anesthesiology* — 1975, 43. — № 3. — P. 392—401.

280. *Taves D. R.* Toxicity following methoxyflurane anesthesia. II. Fluoride concentration in nephrotoxicity // *JAMA* — 1970, 214. — № 1. — P. 91—101.

281. *Butler T. C.* Reduction of carbon tetrachloride *in vivo* and reduction of carbon tetrachloride and chlorophorm *in vitro* by tissues and tissues constituents // *J. Pharmacol.* — 1961, 134, N 2. — P. 311—317.

282. *Van Kuilenburg A., Vreken P., Abeling N. et al.* Genotype and phenotype in patient with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency // *Hum. Genet.* — 1999, 104. — P. 1—9.

283. *Tuchman M., Stoekeler J., Kiang D., et al.* Familial pyrimidenemia and pyrimiduria associated with severe fluorouracil toxicity // *New Eng. J. Med.* — 1985, 313. — P. 245—249.

284. *Milano G., Etienne M., Pierrefite V., et al.* Dehydropyridine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity // *Brit. J. Cancer* — 1999, 79. — P. 627—630.

285. *Mattison L., Soong R., Diasio R.* Implication of dehydropyrimidine dehydrogenase on 5-fluorouracil pharmacogenetics and pharmacogenomics // *Pharmacogenomics* — 2002, 3(4) — P. 485—492.

286. *Sumi S., Imaeda M., Kidonchi K. et al.* Population and family studies of dehydropyrimidinuria prevalence, inheritance mode, and risk of fluorouracil toxicity // *Am. J. Med. Genet.* — 1998, 78. — P. 336—340.

287. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. — М.: Мир, 1982. — Т. 1—3. — 1119 с.
288. Aldridge W. Serum esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolyzing *p*-nitrophenyl acetate, propionate and butirate and a method for their determination // Biochem. J. — 1973, 53, № 1. — P. 110—115.
289. Aldridge W. Serum esterases. 2. An enzyme hydrolyzing diethyl *p*-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with A-esterase of mammalian sera // Ibid. — 1953, 53, № 1. — P. 117—123.
290. Main A. The purification of the enzyme hydrolyzing diethyl *p*-nitrophenyl phosphate (paraoxon) in sheep serum // Ibid. — 1960, 74, № 1. — P. 10—16.
291. Main A. The differentiation of the A-type esterases in sheep serum // Ibid. — 75, № 2. — P. 188—195.
292. Kojima K., O'Brien R. Paraaxon hydrolyzing enzymes in rat liver // J. Agr. Food. Chem. — 1968, 16, № 4. — P. 574—579.
293. Becker E., Barbaro J. The enzymatic hydrolysis of *p*-nitrophenyl ethylphosphonates by mammalian plasma // Biochem. Pharmacol. — 1959, 3, № 1. — P. 60—69.
294. Davies H., Richter R., Keifer M., et al. The effect of the human serum paraoxanase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin // Nature Genet. — 1996, 14. — P. 334—336.
295. Yamasaki Y., Sakamoto K., Watada H., et al. The arg-192 isoform of paraoxanase with low sarin- hydrolyzing activity is dominant in the Japanese // Hum. Genet. — 1997, 101. — P. 67—68.
296. Shih D., Gu L., Xia Y., et al. Mice lacking serum paraoxanase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis // Nature — 1998, 394. — P. 284—287.
297. Inone M., Morikawa M., Tsuboi T., et al. Hydrolysis of ester-type drugs by the purified esterase from human intestinal mucosa // Jpn. J. Pharmacol. — 1979, 29. — P. 17—25.
298. Heymann E. Hydrolysis of carboxylic esters and amides. In.: Metabolic basis of detoxication. Metabolism of functional groups. — New York, London, Academic Press. — 1982. — P. 229—245.
299. Junge W., Krisch K. The carboxylesterases/amidases of mammalian liver and their possible significance // CRC Crit. Rev. Toxicol. — 1975, 3. — P. 371—434.
300. Ecobichon D., Comeau A. Genetic polymorphism of plasma carboxylesterases in the rabbit: Correlation with pharmacologic and toxicologic effects // Toxicol. Appl. Pharmacol. — 1974, 27. — P. 28—40.
301. Dauterman W. Extramicrosomal metabolism of insecticides. — In.: Insecticide biochemistry and physiology. — New York, Academic Press. — 1976. — P. 149—176.
302. McGuire S., Nogueira C., Bartels C., et al. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase // Proc. Nat. Acad. Sci. — 1989, 86. — P. 953—957.

303. *Hernandez O., Bend J.* Metabolism of epoxides. — In.: Metabolic basis of detoxication. Metabolism of functional groups. — New York, London, Academic Press. — 1982. — P. 207—228.

304. *Oesch F., Daly J.* Solubilization, purification and properties of hepatic epoxide hydrase // *Biochem. et biophys. Acta.* — 1971, 227, № 4. — P. 692—699.

305. *Oesch F., Jerina D., Daly J.* A radiometric assay for hepatic epoxide hydrase activity with (7-H)-styrene oxide // *Ibid.* — 1971, 227, № 4. — P. 685—691.

306. *Buehler B., Delimont D., van Waes M., et al.* Prenatal prediction of risk of the fetal hydantoin syndrome // *New Eng. J. Med.* — 1990, 322. — P. 1567—1571.

307. *Mumby S., Hammock B.* Substrate selectivity and stereochemistry of enzymatic hydration in the soluble fraction of mouse liver // *Pestic. Biochem. Physiol.* — 1979, 11. — P. 275—284.

308. *Uchida T., Dauterman W., O'Brien R.* The metabolism of dimethoate by vertebrate tissues. // *J. Agr. and Food Chem.* — 1976, 367, № 8. — P. 1022—1028.

309. *O'Brien R.* Properties and metabolism in the cockroach and mouse of malathion and malaoxon // *J. Econ. Entomol.* — 1957, 50, № 1. — P. 159—263.

310. *Arudt R., Schlaak H., Ustthrin D., et al.* Investigations on the functional role of rat liver carboxylesterase isoenzymes // *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* — 1978, 359. — P. 641—651.

311. *Mameli L., Gianetto R.* Comparative binding of albumin and β -glucuronidase by rat liver microsomes // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* — 1973, 50, № 2. — P. 316—320.

312. *Owens J., Gammon K., Stahl F.* Multiple forms of β -glucuronidase in rat liver lysosomes and microsomes // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1975, 166, № 1. — P. 258—272.

313. *Owens J., Stahl P.* Purification and characterization of rat liver microsomal β -glucuronidase // *Biochem. et biophys. acta.* — 1976, 438, № 2. — P. 474—486.

314. *Shiro T., Kenneth O.* Egasyn a protein complexes with microsomal β -glucuronidase. — *Ibid.*, № 3. — P. 1146—1148.

315. *Masaru H., Yoichi H., Keitaro K.* β -glucuronidase of bovine liver. Purification, properties, carbohydrate composition // *J. Biochem.*, 1974, 76, № 6. — P. 1243—1252.

316. *Csala M., Banhegy G., Braun L., et al.* β -glucuronidase latency in isolated murine hepatocytes // *Biochem. Pharmacol.* — 2000, 59, № 7. — P. 801—805.

317. *Lotsch J., Sperker B., Heyo K. et al.* Verapamil decreases glucuronidase activity in the gut // *Biochem. Pharmacol.* — 2000, 63, № 8. — P. 1575—1578.

318. *O'Leary K., Day A., Needs P. et al.* Flavonoid glucuronides are substrates for human liver β -glucuronidase // *FEBS Letters* — 2001, 503, № 1. — P. 103—106.

319. *Recher A., Kuhnle G., Bremmer P. et al.* The metabolic fate of dietary polyphenols in humans // *Free Radic. Biol. And Med.* — 2002, 33, № 2. — P. 220—235.

320. *Faraogni A. A.* Sulfatases, sulfate esters and their metabolic disorders // *Clin. Chim. Acta.* — 1980, 100, № 3. — P. 285—299.
321. *Mellon S., Griffin L.* Neurosteroids: biochemistry and clinical significance // *Trends in Endocrinology and Metab.* — 2002, 13. — № 1. — P. 35—43.
322. *Kauffman F., Sharp S., Allan B., et al.* Microsomal steroid sulfatase: interactions with cytosolic sulfotransferases // *Chem. — Biol. Interact.* — 1998, 109, № 1—3. — P. 169—182.
323. *Slaus K., Coughtrie M., Sharp S., et al.* Influence of culture system and medium enrichment of sulfotransferase and sulfatase expression in male rat hepatocyte cultures // *Biochem. Pharmacol.* — 2001, 61, № 9. — P. 1107—1117.
324. *Brooks D., Hopwood J. et al.* Two side-directed mutation abrogate enzyme activity but have different effects on the conformation and cellular content of the N-acetylgalactosamine-4-sulfatase protein // *Biochem. J.* — 1995, 307. — P. 457—463.
325. *Branden C.* Relation between structure and function of α/β proteins // *Q. Rev. Biophys.* — 1980, 13. — P. 317—338.
326. *Parenti G., Meroni G., Ballabio A., et al.* The sulfatase gene family // *Cur. Op. Genet. Develop.* — 1997, 7. — P. 386—391.
327. *Hodson E., Casida J.* Mammalian enzymes involved in the degradation of 2,2-dichlorovinildimethylphosphate // *J. Agr. and Food Chem.* — 1962, 10, № 2. — P. 208—211.
328. *Dauterman W.* Extramicrosomal metabolism of insecticides. — In.: *Insecticide biochemistry and physiology* / Ed. C. Wilkinson New York, Academic Press. — 1976 — P. 149—176.
329. *Богатский А. В., Андронати С. А., Головенко Н. Я.* Транквилизаторы (1,4-бенздиазепины и родственные структуры). — К.: Наук. думка, 1980. — 280 с.
330. *Богатский А. В., Головенко Н. Я., Андронати С. А.* Участие редокс-цепи микросом печени крыс в сужении кольца 1,4-бенздиазепинов // *Докл. АН СССР.* — 1974, 234. — № 1. — С. 215—218.
331. *Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г., Андронати С. А.* Масс-спектрометрический анализ производных 2-аминобензофенонов и их метаболитов // *Биоорганическая химия* — 1986, 5. — С. 686—694.
332. *Богатский А. В., Зиньковский В. Г., Головенко Н. Я.* Пути метаболизма 3Н-5-бром-2'-хлор-2-аминобензофенона в организме крыс и мышей // *Изв. АН СССР, сер. биол.* — 1983, 5. — С. 770—776.
333. *Schwandt H., Sadee W., Beyer K.* Metabolic rearrangement of 1,4-benzodiazepine derivatives // *Xenobiotica*, 1974, 4, № 12. — P. 333—741.
334. *Головенко Н. Я., Карасева Т. Л.* Выделение с желчью нитразепама и его метаболитов // *Фармакол. Токсикол.* — 1978, 41. — № 1: — С. 17—19.
335. *Головенко Н. Я.* Синтез аминоглюкуронидов в организме белых крыс. Зависимость процесса от физико-химических свойств субстрата // *Вопр. мед. хим.* — 1978, 24. — № 5. — С. 676—678.
336. *Israili Z. H., Dayton P. G., Kiechel J. R.* Novel routes of drug metabolism // *Drug Metab. and Dispos. Biol. Fate Chem.* — 1977, 5, № 4. — P. 411—415.

337. *Samani S., Anderson J. H.* Microsomal glucuronidation of a quaternary ammonium compound 3-hydroxyphenyltrimethylammonium // *Drug Metab. and Dispos. Biol. Fate Chem.* — 1977, 5, № 1. — P. 15—18.
338. *Richer, Alt K., Dieterle W., et al.* C-glucuronides, a novel type of drug metabolism // *Helv. Chim. Acta* — 1975, 58. — № 8. — P. 2512—2517.
339. *Tukey R., Strassburg C.* UDP-glucuronosyltransferase: metabolism, expression and disease // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 2000, 40. — P. 3—29.
340. *Ritter J.K., Chen F., Sheen Y.Y., et al.* A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isozymes with identical carboxyl termini // *J. Biol. Chem.* — 1992, 267. — P. 32573—32579.
341. *Burchell B.* Transformation reaction glucuronidation. In.: *Handbook of drug metabolism.* — New York, Marcel Dekker. — 1999. — P. 153—173.
342. *Burchell B., McGurk K., Brierly C. et al.* In.: *Glucuronidation, conjugation reactions in drug metabolism: An integrated approach.* London, Taylor Francis. — 1996. — P. 401—435.
343. *Ritter J., Crawford J., Owens I.* Cloning of two human liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNAs with expression in COS-1 cells // *J. Biol. Chem.* — 1991, 266. — P. 1043—1047.
344. *Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome / Monaghan G., Ryan M., Seddon R., Hume R., et al* // *Lancet.* 1996, 347. — P. 578—581.
345. *Bosma P. J., Chowdhury J. R., Bakker C. et al.* The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome // *N. Engl. J. Med.*, 1995, 333. — P. 1171—1175.
346. *Peters W. H., Kock L., Nagengast F. M. et al.* Biotransformation enzymes in human intestine: critical low levels in the colon // *Gut.* 1991, 32. — P. 408—412.
347. *Strassburg C. P., Nguyen N., Manns M. P. et al.* Polymorphic expression of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A gene locus in human gastric epithelium // *Mol. Pharmacol.* — 1998, 54. — P. 647—654.
348. *Philipp T., Durazo M., Trautwein C. et al.* Recognition of uridine diphosphate glucuronosyl transferases by LKM-3 antibodies in chronic hepatitis D // *Lancet.* — 1994, 344. — P. 578—581.
349. *Patel M., Tang B., Kalow W.* (S)-oxazepam glucuronidation is inhibited by ketoprofen and other substrates of UGT2B7 // *Pharmacogenetics* — 1995, 5. — P. 43—29.
350. *Patel M., Tang B., Grant D., Kalow W.* Interindividual variability in the glucuronidation of (S) oxazepam contrasted with that of (R) oxazepam // *Ibid.* — 1995, 5. — P. 287—297.
351. *Franklin M. R.* Simultaneous hepatic microsomal oxidation of P-nitroanisole and glucuronides conjugation of p-nitrophenol // *Biochem. Sol. Trans.* — 1974, 2, № 5. — P. 891—894.

352. *Minck K., Schupp R. R., Illing H. P. et al.* Interrelationship between demethylation of *p*-nitroanisole and conjugation of *p*-nitrophenol in rat liver // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* — 1973, 279, № 2. — P. 347—360.

353. *Vainio H.* Linkage of microsomal drug oxidation and glucuronidation. In: *Proc. 6th Int. Congr. Pharmacol. Oxford.* — 1976. — Vol. 6. — P. 53—56.

354. *Hanninen O., Puukka R.* Activation of microsomal UDP-glucuronosyltransferase by phospholipases // *Chem. Biol. Interact.* — 1971, 3, № 3. — P. 282—284.

355. *Vainio H.* Drug hydroxylation and microsomes of phenobarbital treated rats // *Xenobiotica.* — 1973, 3. — № 4. — P. 715—725.

356. *Vainio H., Hietanen E.* Induction deficiency of the microsomal UDP-glucuronosyl transferase by 3-methylcholantrene in Gunn rats // *Biochim. et biophys. acta.* — 1974, 362, № 1. — P. 92—99.

357. *Hietanen E.* Development of hepatic uridine diphosphoglucuronosyl transferase activity in growing male rats // *Biol. Neonate.* — 1977, 31, № 1, 2. — P. 135—140.

358. *Oesch F.* Mammalian epoxide hydrolases: inducible enzymes catalyzing the inactivation of carcinogenic and cytotoxic metabolites derived from aromatic and olefinic compounds // *Xenobiotica.* — 1973, 3, № 5. — P. 305—340.

359. *Murray M. D., Brater D. C.* Renal toxicity of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 1993, 32. — P. 435—465.

360. *Smith P., McDonagh A., Benet L.* Irreversible binding of Zomepirac plasma protein *in vitro* and *in vivo* // *J. Clin. Invest.* — 1986, 77. — P. 934—939.

361. *Smith P., Lin J.* Covalent binding of suprofen acyl glucuronides to albumin *in vitro* // *Xenobiotica* — 1993, 23. — P. 337—348.

362. *Yamashita A., Nagatsuka T., Watanabe M., et al.* Inhibition of UDP-glucuronosyltransferase activity by fatty acyl-KoA: kinetic studies and structure-activity relationship // *Biochem. Pharmacol.* — 1997, 53. — P. 561—570.

363. *Sphan-Langguth H., Benet L.* Acyl glucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as detoxification mechanism? // *Drug Metab. Rev.* — 1992, 24. — P. 5—48.

364. *Gautam A., Seligdon H., Gordon E. et al.* Irreversible binding of conjugated bilirubin to albumin in cholestatic rats // *J. Clin. Invest.* — 1984, 73. — P. 873—877.

365. *Heirwech K., Menwissen J., Tevery J.* Critique of the assay and significance of bilirubin conjugation // *Adv. Clin. Chem.* — 1973, 16. — № 2. — P. 239—242.

366. *Helting T., Peterson P.* Galactosyltransferase in mouse mastacytoma. Synthesis of a galactose-containing polar metabolic of retinol // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* — 1972, 46. — № 2. — P. 426—435.

367. *Labow R., Williamson D., Layne D.* Effect of protease of crude phospholipases on steroid glucosyltransferases from rabbit liver // *Biochemistry.* — 1973, 12. — № 11. — P. 1548—1554.

368. *Maudal H.* Pathways of drug biotransformation: Biochemical conjugation. In: Fundamentals of drug metabolism and drug desposition. — Baltimore, Williams and Wilkins. — 1971. — P. 149—186.
369. *Collins D., Williamson D., Layne D.* Steroid glucosides, enzymatic synthesis by a partial purified transferase from rabbit liver microsomes // J. Biol. Chem. — 1970, 245. — № 4. — P. 873—887.
370. *Dogson K.* Conjugation with sulfate. In.: Drug metabolism from microbe to man. Proc. Intern Symp. — London, Univ. Survey. — 1977. — P. 92—104.
371. *Powell J., Miller J., Olavesen A. et al.* Liver a major organ of phenol detoxication // Nature — 1974, 252. — № 2. — P. 234—237.
372. *Gatehouse P., Roy A., Dogson K. et al.* The metabolism of sodium cortisone 21-[³⁵S]sulfate in the rat // Biochem. J. — 1972, 127. — № 4. — P. 661—672.
373. *Bostrom H., Vestermark A.* Studies of enter sulfates. 7. On the excretion of sulphate conjugates in primary aliphatic alcohols in the urine of rats // Acta Physiol. Scand. — 1960, 48. — № 1. — P. 88—99.
374. *Weinshiboum R.* Sulfotransferase pharmacogenetics // Pharmacol. Ther. — 1990, 45. — P. 93—105.
375. *Glatt H., Engelke C., Pabel U. et al.* Sulfotransferases: genetics and role in toxicology // Toxicol. Lett. — 2000, 15. — P. 341—348.
376. *Zhu X., Veronese M., Iocco P. et al.* cDNA cloning and expression of a new form of human aryl sulfotransferase // Int. J. Biochem. Cell Biol. — 1996, 28. — P. 565—571.
377. *Price R., Spielman R., Lucena A., et al.* Genetic polymorphism of human platelet thermostable phenol sulphotransferase (TLPST) activity // Genetics — 1989, 122. — P. 905—911.
378. *Brix L., Duggley R., Gaedigk A., et al.* Structural characterization of human aryl sulphotransferases // Biochem. J. — 1999, 15. — P. 337—343.
379. *Birnier F., Soucy P., Luu V.* The human phenol sulphotransferase gene contains two alternative promoters: structure and expression of the gene // DNA Cell Biol. — 1996, 28. — P. 367—373.
380. *Boyland E., Kinder C., Manson D.* Synthesis and detection of di-(2-amino-1-naphtyl)hydrogen phosphate, a metabolite of 2-naphtylamine in dogs // Biochem. J. — 1961, 78, № 1. — P. 175—182.
381. *Troll W., Tessler A., Nelson N.* Bis-(0-amino-1-naphtyl)phosphate, a metabolite of β -naphthylamine in human urine // J. Urol., 1963, 89, № 4. — P. 626—632.
382. *Borchar R., Cheng C.* Purification and characterization of rat liver microsomal thiolmethyltransferase // Biochem. et Biophys. acta — 1978, 522, № 3. — P. 340—353.
383. *Bonze G., Mentzler M.* Biotransformationen organischer Fremdsbstanzen, Stuttgart // Thieme, 1978. — 100 S.
384. *Holloway C., Hulsmann-Holloway S., Brunner G.* Enzymatic methylation of alkane thiols // Enzyme, 1979, 24, № 5. — P. 307—312.
385. *Weinshiboum R.* Methyltransferase pharmacogenetics // Pharmacol. Ther. — 1989, 43. — P. 77.

386. *Weinshiboum R., Sladek S.* Mercaptopurine pharmacogenetics: Monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity // *Am. J. Hum. Genet.* — 1980, 32. — P. 651—662.

387. *Lennard L., Lilleyman J., VanLoon J. et al.* Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute leukemia // *Lancet* — 1990, 236. — P. 225—232.

388. Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г. Сравнительная фармакокинетика и метаболизм феназепама в организме различных видов экспериментальных животных. В кн.: Феназепам. — К.: Наукова думка, 1982. — С. 32—87.

389. Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г., Богатский А. В. и др. Метаболизм феназепама в организме крыс // *Хим.-фарм. ж.* — 1980. — № 4. — С. 15—21.

390. Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г., Василинин Г. Б. и др. Масс-спектрометрическое изучение метаболитов бромнордиазепама // *Хим.-фарм. ж.* — 1988, 22, № 7. — С. 779—783.

391. *Evans D. A.* N-acetyltransferase // *Pharmacol. Ther.* — 1989, 42. — P. 157—172.

392. Головенко Н. Я., Карасева Т. Л., Курушин А. А. Ацелирование 7-аминопроизводного нитразепама субклеточными фракциями некоторых органов и кровью белых крыс // *Вопр. мед. хим.* — 1978. — № 1. — С. 17—19.

393. *Vatsis K., Weber W., Bell D. et al.* Nomenclature of N-acetyltransferases // *Pharmacogenetics* — 1995, 5. — P. 1—27.

394. *Grant D., Hughes N., Janezic S. et al.* Human acetyltransferase polymorphism // *Mutat. Res.* — 1997, 61. — P. 371—379.

395. *Buteher N., Ilett K., Minchin R.* Functional polymorphism of the human N-acetyltransferase type 1 gene caused by C190T and G560A mutations // *Pharmacogenetics* — 1998, 8. — P. 67—73.

396. *Caldwell J., Idle J., Smith R.* The amino acid conjugations. In.: Extrahepatic metabolism of drugs and other foreign compounds. — New York, Scientific Book. — 1980. — P. 453—477.

397. *Caldwell J.* Structure-activity relationships in the amino acid conjugation. In.: Conjugation reaction in drug biotransformation — Amsterdam, Elsevier, 1978. — P. 111—120.

398. Тиунов Л. А. Основные механизмы метаболизма ксенобиотиков в организме человека и животных // *Итоги науки и техн. ВИНТИ, Токсикология*, 1981. — С. 5—64.

399. Биохимические механизмы токсичности оксидов азота / Л. А. Тиунов, Н. Я. Головенко, Б. Н. Галкин, В. А. Баринов // *Успехи соврем. биологии* — 1991, 111. — С. 738—750.

400. *Hayes J., Pulford D.* The glutathione S-transferase supergene family: Regulation of GST and contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* — 1995, 30. — P. 445—600.

401. *Harada S., Abei S., Tanaka M., et al.* Liver glutathione S-transferase in polymorphisms in Japanese and its pharmacogenetic importance // *Hum. Genet.* — 1987, 75. — P. 322—325.

402. Board P., Coggan M., Johnston M. et al. Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: a complex of gene families // Pharm. Therap. — 1990, 48. — P. 357—369.

403. Widersten M., Pearson W., Engstrom A. et al. Heterologous expression of the allelic variant mu-class glutathione transferases mu and psi // Biochem. J. — 1991, 276. — P. 519—527.

404. Henderson C., Wolf C., Kitteringham N., et al. Increased resistance to acetaminophen hepatotoxicity in mice lacking glutathione S-transferase Pi // Proc. Nat. Acad. Sci. — 2000, 97. — P. 12741—12745.

405. Caldwell J. Conjugation of xenobiotic carboxylic acids. In.: Metabolic basis of detoxication. Metabolism of functional groups. — New York, Academic Press — 1982. — P. 271—290.

406. Зиньковский В. Г., Богатский А. В., Головенко Н. Я. и др. Кинетика выведения ^{14}C -феназепама из организма крыс при однократном и длительном введении препарата // Бюлл. exper. биол. и мед. — 1979. — № 6. — С. 597—600.

407. Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г., Станкевич Е. А. и др. Метаболизм, экспериментальная и клиническая фармакокинетика гидазепама. В кн.: Гидазепам. — К.: Наукова думка, 1992. — С. 20—63.

408. Богатский А. В., Назаров Е. И., Головенко Н. Я. Физико-химические основы поиска фармакологически активных веществ в ряду полифункциональных макрогетероциклов // Вестник Академии медицинских наук СССР — 1984. — № 11. — С. 8—12.

409. Богатский А. В., Назаров Е. И., Головенко Н. Я. Биологические аспекты действия краун эфиров и их аналогов // ЖВХО им. Д. И. Менделеева. — 1975. — № 5. — С. 593—599.

410. Weiner I. M. Excretion of drugs by the kidney — In.: Concepts in biochemical pharmacology. Eds. Brodie B. B., Gillette J. R. Berlin, Springer—Verlag. — 1971. — P. 328—353.

411. Натогин Ю. В. Мембраны клетки нефрона и трансцеллюлярный транспорт. — В кн.: Структура и функции биологических мембран. — М.: Наука, 1975. — С. 307—326.

412. Ulrich K. H. Sugar, aminoacid Na^+ cotransport in the proximal tubule // Ann. Rev. Physiol. — 1979, 41. — P. 181—210.

413. Heidiger M., Coady M., Ikeda M. et al. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na^+ / glucose cotransporter // Nature, 1987, 330. — P. 379—381.

414. Carr A., Frei B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans // American Journal of clinical nutrition — 1999, 66. — P. 1086—1107.

415. Vera J., Rivas C., Velasques F. et al. Resolution of the facilitated transport of dehydroascorbic acid from its intracellular accumulation as ascorbic acid // J. Biol. Chem. — 1995, 270. — P. 23706—23712.

416. Liang W. J., Johnson D., Jarvis S. Vitamin C transport systems of mammalian cells // Molecular membrane biology — 2001, 18. — P. 87—95.

417. Wang Y., Mackenzie B., Trukaguchi N. et al. Human vitamin C (L-ascorbic acid) transporter SVCT1 // Bioch. Biophys. Res. Comm. — 2000, 267. — P. 488—494.
418. Rubio-Aliaga I., Hannelore D. Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery // Trends in pharmacological sciences — 2002, 23, № 9. — P. 434—440.
419. Рокачинская М. Г., Головенко Н. Я., Кабанов В. М. и др. Биологические аналоги меланостатина // Физиол. акт. вещества — 1991, 23. — С. 46—49.
420. Шапиро Ю. Е., Горбатюк В. Я., Головенко Н. Я. и др. Конформационные особенности биологически активных аналогов меланостатина. // Биоорганическая химия. — 1990, 16, № 12. — С. 1607—1617.
421. Рокачинская М. Г., Кабанов В. М., Головенко Н. Я. и др. Синтез и распределение в организме HCl—Pro—Phe^[14C]—Gly—NH₂. // Хим. фарм. журн. — 1992, 26. — С. 16—18.
422. Pan Y. Expression of cloned ovine gastrointestinal peptide transporter (oPepT1) in xenopus oocytes induces uptake of oligopeptides *in vitro* // J. Nutr. — 2001, 131. — P. 1264—1270.
423. Terada T. Functional expression of novel peptide transporter in renal basolateral membranes // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. — 2000, 279. — P. 851—857.
424. Boll M. Expression cloning of a CDNA from rabbit small intestine related to proton-coupled transport of peptides, β -lactam antibiotics and ACE-inhibitors // Pflügers Arch. — 1994, 29. — P. 146—149.
425. Grundenmann D., Babin-Ebell J., Martel F., et al. Primary structure and functional expression of the apical organic cation transporter from kidney epithelial LLC-PK₁-cells // J. Biol. Chem. — 1997, 272. — P. 10408—10413.
426. Kusuvara H., Sekine T., Utsunomiya-Tate N. et al. Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain // J. Biol. Chem. — 1999, 274. — P. 13675—13680.
427. Cha S., Sekine T., Kusuvara H., et al. Molecular cloning and characterization of multispecific organic anion transporter 4 expressed in the placenta // J. Biol. Chem. — 2000, 275. — P. 4507—4512.
428. Asaba H., Hosoya K., Takanaga H. et al. Blood-brain barrier is involved in the efflux transport of neuroactive steroid, dehydroepiandrosterone sulfate, via organic anion transporting polypeptide 2 // Neurochem. — 2000, 75. — P. 107—116.
429. Ling V. Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance // Cancer Chemother. Pharmacol. — 1997, 40. — P. 3—8.
430. Garrigues A., Loiseau N., Delaforge M., et al. Characterization of two pharmacophores on the multidrug transporter P-glycoprotein // Mol. Pharmacol. — 2002, 62, № 6. — P. 1288—1298.
431. Cole S., Deley R. Transport of xenobiotic and endobiotic metabolites by the MRP-related transporters // Pharmacologist — 2002, 44, 2 (suppl.) — P. A7.

432. *Leier I., Jedlitschky G., Buchholz U., et al.* ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump // *Biochem. J.* — 1996, 314. — P. 433—437.

433. *Aleov-El-Maharem M., Millburn R., Smith R. et al.* Biliary excretion of foreign compounds: benzene and its derivatives in the rat // *Ibid.* — 1967, 105. — № 7. — P. 1269—1274.

434. *Hirom P., Millburn R., Smith R., et al.* Studies on the relationship between molecular structure and the biliary excretion of organic compounds // *Ibid.* — 1969, 113. — № 1. — P. 27—28.

435. *Smith R.* Excretion of drugs in bile. — In.: *Concept in biochemical pharmacology*. Eds. Brodie B. B., Gillette J. R. Berlin, Springer-Verlag. — 1971. — P. 354—389.

436. *Hucker H., Zacchei A., Cox S. et al.* Studies on the absorption, distribution and excretion of indomethacin in various species // *J. Pharmacol. And Exper. Therap.*, 1966, 153. — № 3. — P. 237—249.

437. *Aleov-El-Maharem M.* Biliary excretion of foreign compounds: species differences in biliary excretion. *Biochem. J.*, 1967, 105. — № 12. — P. 1287—1293.

438. *Oliverio V., Davidson J.* The physiological disposition of dichloromethotrexate-Cl in animals // *J. Pharmacol. an Exper. Therap.*, 1962, 137. — № 1. — P. 76—83.

439. *Hoenig V., Preteux F.* Hepatic disposition of tilorone hydrochloride in the rat // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 1980, 7. — № 3. — P. 339—343.

440. *Андронати С. А., Литвинова Л. А., Головенко Н. Я.* Пероральный индуктор эндогенного интерферона амиксин и его аналоги (обзор литературы и собственные исследования) // *Журнал Академії медичних наук України.* — 1999. — Т. 5. — С. 53—66.

441. *Головенко Н. Я., Карасева Т. Л.* Выделение с желчью нитразепама и его метаболитов у крыс // *Фармакол. и токсикол.* — 1978. — Т. 51. — № 1. — С. 17—19.

442. *Богатский А. В., Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г.* Внутривенная циркуляция ¹⁴С-феназепама и его метаболитов в организме белых крыс // *Бюлл. экпер. биол. и мед.* — 1980, № 1. — С. 27—29.

443. *Rasmussen F.* Excretion of drugs in milk. In.: *Concepts in biochemical pharmacology*. Eds. Brodie B. B., Gillette J. R. — Berlin, Springer-Verlag, 1971. — P. 390—402.

444. *Головенко Н. Я.* Фармакогенетика і біоінформатика // *Вісн. фармакол. та фармації.* — 2002. — № 2. — С. 2—8.

445. *Лильин Е. Т., Рибников В. И., Ванюков М. М.* Введение в современную фармакогенетику. — М.: Медицина, 1984. — 160 с.

446. *Evans D.* Genetic factors in drug therapy, clinical and molecular pharmacogenetics. Cambridge, University Press. — 1993. — 276 p.

447. *Nelson D. R.* Cytochrome P450 and the individuality of species // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1999, 369. — P. 1—10.

448. *Середенин С. Б., Вахитова Ю. В., Вахитов В. А.* Молекулярно-биологические подходы к созданию геноспецифических фармакологических препаратов // *Эксперим. и клин. фармакол.* — 2001, 64, № 3. — С. 3—12.

449. *Butler M., Lang N., Young J. et al.* Determination of CYP1A2 and acetyltransferase phenotyp in human population by analysis of caffeine urinary metabolites // *Pharmacogenetics* — 1992, 2. — P. 116—121.
450. *Fernandes-Salguero P., Hoffman P., Cholerton S. et al.* A genetic polymorphism in coumarin 7-hydroxylation; sequence of the human CYP2A genes and identification of variant CYP2A6 alleles // *Am. J. Hum. Genet.* — 1995, 51. — P. 651—660.
451. *Rautio A., Kraul H., Kojo A. et al.* Interindividual variation of coumarin 7-hydroxylase in healthy volunteers // *Pharmacogenetics* — 1992, 2. — P. 227—234.
452. *Sullivan-Klose T., Ghanayem B., Bell D. et al.* The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism // *Pharmacogenetics* — 1996, 6. — P. 341—349.
453. *Morais S., Wilkinson G., Blaisdell J. et al.* Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese // *Mol. Pharmacol.* — 1994, 46. — P. 594—599.
454. *Idle J., Mahgoub A., Lancaster R., et al.* Hypotensive response to debrisoquine and hydroxylation phenotype // *Life sci.* — 1978, 22. — P. 979—984.
455. *Gonsales F., Idle J.* Pharmacogenetic phenotyping and genotyping. Present status in drug metabolism an clinical response // *Trends Pharmacol. Sci.* — 1992, 13. — P. 434—442.
456. *Johansson J., Lundqvist E., Bertilsson L., et al.* Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause ultrarapid metabolism of debrisoquine // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1993, 90. — P. 11825—11831.
457. *Broly F., Meyer U.* Debrisoquine oxidation polymorphism. Phenotypic consequences of a 3-base-pair deletion in exon 5 of the CYP2D6 gene // *Pharmacogenetics* — 1993, 3. — P. 123—128.
458. *Lee S., Buters J., Pineau T., et al.* Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen // *J. Biol. Chem.* — 1996, 271. — P. 12063—12070.
459. *Aoyama T., Samano S., Waxman D., et al.* Cytochrome P450 hPCN3, a novel cytochrome P450 II A gene product that is differentially expressed in adult human liver // *J. Biol. Chem.* — 1989, 264. — P. 10388—10394.
460. *Nebert D., Russele D.* Clinical importance of the cytochromes P450 // *Lancet* — 2002, 360. — P. 1155—1162.
461. *Fisslthaler B., Popp R., Kis L., et al.* Cytochrome P4502C is an EDHF syntase in coronary arteries // *Nature.* — 1990, 401. — P. 493—497.
462. *Meyer U., Zanger U.* Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 1997, 37. — P. 269—296.
463. *Araya Z., Wikwall K.* 6 α -Hydroxylation of taurochenodeoxycholic acid and lithocholic acid by CYP3A4 in human liver microsomes // *Biochim. Biophys. Acta* — 1999, 1438. — P. 47—54.
464. *Simpson A.* The cytochrome P450-4 (CYP4) family // *Gen. Pharmacol.* — 1991, 28. — P. 351—359.

465. *Tuder R., Cool C., Yeager M., et al.* The patho-biology of pulmonary hypertension: the endothelium // *Clin. Chest. Med.* — 2001, 22. — P. 405—418.

466. *Lund E., Guileyardo J., Russell D., et al.* Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P450 sterol 27-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1999, 96. — P. 7238—7243.

467. *Pullinger C., Eng C., Salen G., et al.* Human cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype // *J. Clin. Invest.* — 2002, 110. — P. 109—117.

468. *Setchell K., Schwarz M., O'Connel N., et al.* Identification of a new inborn error in bile acid synthesis: mutation of the oxysterol 7 α -hydroxylase gene causes severe neonatal liver disease // *Ibid.* — 1998, 102. — P. 1690—1703.

469. *Miler W., Geller D., Auchus R.* The molecular basis of isolated 17,20-lyase deficiency // *Endocr. Res.* — 1998, 24. — P. 817—825.

470. *Nebert D., Kinnon R.* Cytochrome P450: evolution and functional diversity // *Progr. Liv. Dis.* — 1994, 12. — P. 63—67.

471. *White P. C.* Congenital adrenal hyperplasias // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2001, 15. — P. 17—41.

472. *Corchero J., Granvil C., Akiyama T., et al.* The CYP2D6 humanized mouse: effect of the human CYP2D6 transgene and HNF4 α on the disposition of debrisoquine in the mouse // *Mol. Pharmacol.* — 2001, 60. — P. 1260—1267.

473. *Kato S.* Genetic mutation in the human 25-hydroxyvitamin D, 1 α -hydroxylase gene causes vitamin D-dependent rickets type I // *Mol. Cell Endocrinol.* — 1999, 156. — P. 7—12.

474. *Stoilov I., Jansson I., Safarari M., et al.* Roles of cytochrome P450 in development // *Drug Metabol. Drug Interact.* — 2001, 18. — P. 33—35.

475. *Reed D.* Cellular defence mechanisms against reactive metabolites. In.: *Bioactivation of foreign compounds.* — London, Academic Press. — 1985. — P. 71—108.

476. *Gillette J.* Pharmacokinetics of biological activation of foreign compounds // *Ibid.* — P. 29—70.

477. *Дьячков П. Н.* Квантовохимические расчеты в изучении механизма действия и токсичности чужеродных веществ // *Итоги науки и техники. ВИНТИ.* — Сер. токсикология, 1990. — 280 с.

478. *Riley R., Smith G., Wolf C. et al.* Human anti-cytochrome P450 antibodies in aromatic anticonvulsant-induced hypersensitivity reaction // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 1992, 263. — P. 360—367.

479. *Головенко Н. Я., Филиппова Т. О., Галкин Б. Н.* Изменение ферментативной активности монооксигеназ печени мышей при воздействии высокомолекулярных иммуномодуляторов // *Вопр. мед. химии* — 1983. — № 6. — С. 60—63.

480. *Головенко Н. Я., Филиппова Т. О., Галкин Б. Н.* Изменение активности флавопротендзависимой монооксигеназы иммунокомпетентных клеток мышей под влиянием антигена и низкомолекулярных иммуномодуляторов // *Укр. биохим. журн.* — 1984. — № 1. — С. 42—46.

481. Головенко Н. Я., Галкин Б. Н., Филиппова Т. О. Каталитические свойства монооксигеназ изолированных иммунокомпетентных клеток // Биохимия — 1986, 1. — С. 51—58.
482. Головенко Н. Я., Филиппова Т. О., Галкин Б. Н. Характеристика монооксигеназ иммунокомпетентных клеток // Успехи соврем. биологии — 1984, 97, № 2. — С. 268—278.
483. Ortiz de Montellano R. R. The cytochrome P450 oxidative system. — In. Handbook of drug metabolism. — New York, Marcel Dekker. — 1999. — 596 p.
484. Ortiz de Montellano R. R., Mico B. A. Destruction of cytochrome P450 by allylisopropylacetamide in suicidal process // Arch. Biochem. Biophys. — 1981, 206. — P. 43—50.
485. Liebler D. C., Guengerich F. P. Stepwise oxidation of vinylidene chloride by cytochrome P450 // Fed. Proc. — 1983, 42. — P. 1928—1932.
486. Wada O., Yano Y., Urata G., Nakao K. Behavior of hepatic microsomal cytochromes after treatment of mice with drugs known to disturb porphyrin metabolism in liver // Biochem. Pharmacol. — 1968, 17. — P. 595—603.
487. Onisawa J., Labbe R. F. Effects of diethyl-1,4-dihydro-2,4,6-trimethylpyridine-3,5-dicarboxylate on the metabolism of porphyrins and iron // J. Biol. Chem. — 1963, 238. — P. 724—732.
488. Ortiz de Montellano R. R., Kunze K. L., Beilan H. S. Chiral orientation of prosthetic heme in the cytochrome P450 active site // J. Biol. Chem. — 1983, 45. — P. 45—52.
489. Kunze K. L., Mangold B. L., Wheeler C., et al. The cytochrome P450 active site. Regiospecificity of prosthetic heme alkylation by olefins and acetylenes // J. Biol. Chem. — 1983, 258. — P. 4202—4207.
490. Ortiz de Montellano R. R., Beilan H. S., Kunze K. L. N-methylprotoporphyrin IX. Chemical synthesis and identification as the green pigment produced by 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocolidine treatment // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1981, 78. — P. 1490—1497.
491. Hanch C. The use of homolytic, steric and hydrophobic constants in a structure — activity study of 1,3-benzodioxole synergists // J. Med. Chem., 1968, 11. — P. 920—927.
492. Ullrich V., Schnabel K. Formation and binding of carbanions by cytochrome P450 of liver microsomes // Drug Metab. Dispos. — 1973, 1. — P. 176—182.
493. Mansuy D. New iron-porphyrin complexes with metal-carbon bond: Biological implications // Pure and Appl. Chem. — 1980, 52. — P. 681—692.
494. Parke D. V. The metabolism and chemobiokinetics of environmental chemicals. In: The principles and methods in modern toxicology proceed of the international course. Belgrate, Italy (22—26 october, 1979), — 1980. — P. 85—105.
495. Арчаков А. И., Карузина И. И. Окисление чужеродных соединений и проблемы токсикологии // Вестник Академии медицинских наук СССР. — 1988, 1. — С. 14—23.

496. Бутенко Г. М. Механизм возникновения аллергических и аутоиммунных реакций на лекарственные препараты // Современные проблемы токсикологии — 2002, № 2. — С. 4—6.

497. Reyes H., Reisz-Porszasz S., Haukinson O. Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor // Science — 1992, 256. — P. 1193—1195.

498. Wrighton S., Schuetz E., Watkins P., et al. Demonstration in multiple species of inducible hepatic cytochromes P450 and their mRNAs related to the glucocorticoid-inducible cytochrome P450 of the rat // Mol. Pharmacol. — 1985, 28. — P. 312—321.

499. Kawamoto T., Sueyoshi T., Zelko I., et al. Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene // Mol. Cell. Biol. — 1999, 19. — P. 6318—6322.

500. Пентюк А. А., Мороз Л. В., Паламарчук О. В. Поражение печени ксенобиотиками // Современные проблемы токсикологии — 2001, № 2. — С. 8—16.

501. Головенко Н. Я. Парадоксальная роль кислорода в становлении и развитии биосферы // Інтегративна антропологія. — 2003, 1. — С. 17—24.

502. Chamberlain J. Analysis of drugs in biological fluids. — Boca Raton, CRC Press. — 1987. — 219 p.

503. Головенко Н. Я., Жук О. В., Зиньковский В. Г. и др. Расчеты фармакокинетических параметров лекарственных средств (линейные частевые модели). Методические рекомендации. — Киев, 2003. — 20 с.

504. Зиньковский В. Г., Головенко Н. Я., Станкевич Е. А. и др. Соответствие органов и тканей мышей центральному и периферическому отсекам кинетической модели, основанной на данных соотношения лекарство-метаболит в плазме крови и других тканях // Фармакол. и токсикол. — 1987, 6. — С. 65—68.

505. Boroujerdi M. Pharmacokinetics. Principles and application. New York, McGRAW — Hill. — 1999. — 420 p.

506. Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г. Изучение линейных моделей фармакокинетики феназепама // Хим.-фарм. ж. — 1982, 3. — С. 11—16.

507. Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г., Середенин С. Б. Ферментативная модель фармакокинетики феназепама в организме мышей // Хим.-фарм. ж. — 1980, 12. — С. 14—18.

508. Hadingham K. L., Wingrove P., Le Bourdelles B., et al. Cloning of cDNA sequences encoding human α_2 and α_3 γ -aminobutyric acid_A receptor subunits and characterization of the benzodiazepine pharmacology of recombinant α_1 -, α_2 -, α_3 -, and α_5 -containing human γ -aminobutyric acid_A receptors // Mol. Pharmacol. — 1993, 43. — P. 970—975.

509. Huang Q., Liu R. Y., Zhang P., et al. Predictive models for GABA_A/benzodiazepine receptor subtypes — studies of quantitative structure-activity relationships for imidazobenzodiazepines at five recombinant GABA_A/benzodiazepine receptor subtypes [α - χ - β -3- γ -2 (χ = 1—3, 5, and 6)] via comparative molecular field analysis // J. Med. Chem. — 1998. — 41. — P. 4130—4142.

510. *Maitra R., Reynolds J. N.* Modulation of GABA_A receptor function by neuroactive steroids: evidence for heterogeneity of steroid sensitivity of recombinant GABA_A receptor isoforms // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* — 1998, 76. — P. 909—920.

511. *Whiting P. J., McKernan R. M., Wafford K. A.* Structure and pharmacology of vertebrate GABA_A receptor subtypes // *Int. Rev. Neurobiol.* — 1995, 38. — P. 95—98.

512. *Auta J. J., Faust W. B. W., Lambert P. P., et al.* Comparison of the effects of full and partial allosteric modulators of GABA(A) receptors on complex behavioral processes in monkeys // *Behav. Pharmacol.* — 1995, 6(4). — P. 323—332.

513. *Hutcheon B., Morley P., Poulter M. O.* Developmental change in GABA_A receptor desensitization kinetics and its role in synapse function in rat cortical neurons // *J. Physiol.* — 2000, 522. — P. 13—17.

514. *Smith G. B., Olsen R. W.* Identification of a [³H]muscimol photoaffinity substrate in the bovine γ-aminobutyric acid_A receptor α subunit // *J. Biol. Chem.* — 1994, 269. — № 32. — P. 20380—20387.

515. *Boileau A. J., Evers A. R., Davis A. F., Czajkowski C.* Mapping the agonist binding site of the GABA_A receptor: evidence for a β-strand // *J. Neurosci.* — 1999, 19, № 12. — P. 4847—4854.

516. *Комиссаров И. В.* Механизмы химической чувствительности синаптических мембран. — К.: Наукова думка, 1986. — 240 с.

517. *Colquhoun D.* Affinity, Efficacy and Receptor Classification: Is the Classical Theory Still Useful? In: *Perspectives on Receptor Classification.* — London (G.B.): Alan R. Liss Ink., 1987. — P. 103—114.

518. *Абрамец И. И., Комиссаров И. В.* О природе потенцирования эффектов гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) бензодиазепиновыми транквилизаторами // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* — 1982, 94. — № 10. — С. 58—61.

519. *Furchgott R. F.* The use of beta-haloalkylamines in the differentiation of receptors and in the determination of dissociation constants of receptor-agonist complexes. In: *Advances in drug research.* Harper&Simmonds (EDS) — Vol. 3. — New York: Academic Press, 1966. — P. 21—55.

520. *Tuk B.* Solving inconsistencies in the analysis of receptor-ligand interactions // *Trends in Pharmacological Science.* — 1996, 17. — P. 403—409.

521. *Kenakin T.* Principles: Receptor theory in pharmacology // *Trends Pharmacol. Sci.* — 2004, 25, № 4. — P. 186—190.

522. *Model M. A., Geneva M. O.* Ligand-receptor interaction rate in the presence of convective mass transport // *Biophysical Journal.* — 1995, 69. — № 6. — P. 69—73.

523. *Kenakin T.* Efficacy as a vector: the relative prevalence and paucity of inverse agonism // *Mol. Pharmacol. Sci.* — 2004, 65. — P. 2—11.

524. *Kenakin T.* Ligand-selective receptor conformation revisited: the promise and the problem // *Trends. Pharmacol. Sci.* — 2003, 24. — P. 346—354.

525. Березин И. В., Клесов А. А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. — М.: Изд-во МГУ, 1976. — 286 с.

526. Kostenis E., Mohr K. Two-point kinetic experiments to quantify allosteric effects on radioligand dissociation // Trends in Pharmacological Science. — 1996, 17. — P. 213—222.

527. Black J. W., Gerskowich V. P., Leff P., Shankley N. P. Analysis of competitive antagonism when this property occurs as part of a pharmacological resultant // British Journal of Pharmacology. — 1986, 89. — № 3. — P. 547—555.

528. Monod J., Wyman J., Changeux J. P. On the nature of allosteric transition: a plausible model // Journal of Molecular Biology. — 1965, 26. — № 3. — P. 306—329.

529. Daeffler L., Landry Y. Inverse agonism at heptaleptical receptors: concept, experimental approach and therapeutic potential // Fundamental & Clinical Pharmacology. — 2000, 14. — № 2. — P. 38—46.

530. Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г. Анализ компонентов судорожного действия коразола в условиях введения мышам сулазепама и его метаболитов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1976. — № 9. — С. 1078—1081.

531. Ariens E. J., Simonis A. M., van Rossum J. M. Molecular Pharmacology: The Mode of Action of Biologically Active Compounds. — London (G.B.): Academic Press, 1964. — 366 p.

532. Tuk B., van Oostenbruggen M. F. Solving inconsistencies in the analysis of receptor-ligand interactions // Trends in Pharmacological Science. — 1996, 17. — P. 403—409.

533. Bergelson L. D. Dynamic lipid heterogeneity and receptor events // Molecular and Membrane Biology. — 1995, 12. — № 1. — P. 125—129.

534. Wells J. W. A Practical Approach to Examination of Receptor-Ligand Interaction. — New York: Oxford University Press, 1992. — 384 p.

535. Kenakin T. Prediction therapeutic value in the lead optimization phase of drug discovery // Nat. Rev. Drug Discov. — 2003, 2. — P. 429—438.

536. The *in vivo* Study of Drug Action / Holford N. H. G., van Boxtel C. J., Holford N. H. G., Danhof M. — New York: Elsevier, 1992. — 72 p.

537. Изодинамический анализ минимальных эффективных доз экзогенных лигандов ГАМК-рецепторного комплекса, как метод оценки механизмов их взаимодействия с медиаторной системой ЦНС / Н. Я. Головенко, В. Г. Зиньковский, О. В. Жук, С. А. Силантьев // Журн. АМН України. — 2000. — 6. — № 2. — С. 219—234.

538. Зиньковский В. Г., Силантьев С. А., Головенко Н. Я. Алостерична та поліконформаційна моделі ГАМК-рецепторного комплексу та алгоритм ізодинамічного аналізу мінімальних ефективних доз екзогенних лігандів // Клінічна фармація. — 2001. — № 1. — С. 58—63.

539. Зиньковский В. Г., Головенко Н. Я., Жук О. В. и др. Особенности взаимосвязи основных фундаментальных характеристик «организм-лекарство» // Журн. АМН України. — 2001. — № 1. — С. 22—32.

540. Зиньковский В. Г., Головенко М. Я., Жук О. В. та ін. Моделювання фармакокінетики проліків і їх метаболітів. 1. Лінійні моделі оптимізації режимів введення проліків // Ліки. — 1998. — № 6. — С. 19—24.

541. Каркищенко Н. Н., Хоронько В. В., Сергеев С. А. и др. Фармакокинетика. — Ростов на Дону: Феникс, 2001. — 384 с.

542. Leff P., Scaramelini C., Law C. et al. A three-state receptor model of agonist action // Trends in pharmacology science. — 1997, 18. — P. 355—361.

543. Kenakin T. Agonist-specific receptor conformations // Ibid. — 1997, 18. — P. 416—417.

544. Зиньковский В. Г., Головенко Н. Я., Жук О. В. Эффекторный анализ принципов функционирования и кооперативности субъединиц ГАМК-БД-рецепторно-ионофорного ансамбля. В кн.: Механизмы действия анксиолитических, противосудорожных и снотворных средств. — Киев: Наук. думка, 1988. — С. 98—175.

545. Зиньковский В. Г., Головенко Н. Я., Богатский А. В. Характер взаимосвязи между противосудорожным действием феназелама и его содержанием в головном мозгу мышей // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 1981. — № 1. — С. 40—42.

546. Зиньковский В. Г., Головенко Н. Я., Жук О. В. Эффекторное моделирование лигандов ГАМК-рецепторного комплекса. Функциональное взаимодействие субъединиц комплекса // Там же. — 1988. — № 5. — С. 529—531.

547. Головенко Н. Я., Жук О. В., Зиньковский В. Г. Эффекторное моделирование лигандов ГАМК-рецепторного комплекса. Модификация конформационных состояний комплекса при совместном введении бенздиазепинов и барбитуратов // Там же. — № 10. — С. 451—453.

548. Зиньковский В. Г., Головенко Н. Я., Жук О. В. Эффекторное моделирование лигандов ГАМК-рецепторного комплекса. Кооперативность процессов и тип модификации комплекса судорожными агентами и их обратными агонистами // Там же. — 1989. — № 4. — С. 453—455.

549. Жук О. В., Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г. Эффекторное моделирование лигандов ГАМК-рецепторного комплекса. Функциональное взаимодействие гипотетического рецептора спиртов с другими субъединицами комплекса // Там же. — 1989. — № 9. — С. 211—213.

550. Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г., Жук О. В. Эффекторное моделирование лигандов ГАМК-рецепторного комплекса. Функциональное взаимодействие мусцимола и экзогенных модуляторов комплекса // Там же. — 1991. — № 6. — С. 625—627.

551. Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г., Жук О. В. и др. Оптимизация метода инфузии обратных агонистов ГАМК-рецепторного комплекса при анализе быстрообратимых эффектов транквилизаторов и этанола // Там же. — 1997. — 123. — № 5. — С. 551—554.

552. Зиньковский В. Г., Станкевич Е., А. Головенко Н. Я. и др. Синтез и особенности фармакокинетики ¹⁴С-метаболита пептидобензофенона и некоторых препаратов бензодиазепинового ряда // Хим.-фармацевт. журн. — 1986, 2. — С. 142—146.

553. Андронати С. А., Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г. Сравнительный анализ фармакокинетики N-замещенных производных 1,4-бенздиазепина // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 1986, 2. — С. 23—26.

554. Керниш-Бовден Э. Основы ферментативной кинетики. — М.: Мир, 1979. — 279 с.

555. Colburn W. A. Simultaneous pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling // J. Pharmacokinet. and biopharmacol. — 1981, 3. — P. 367—388.

556. Головенко Н. Я., Громов Л. О. Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних протисудомних препаратів: Методичні рекомендації. — Київ, 2003. — 26 с.

557. Дорохов В. В., Холодов Л. Е. Анализ связи между фармакокинетическими процессами и фармакологическим эффектом у человека // Фармакол. и токсикол. — 1985. — № 5. — С. 119—125.

558. Boronjerdi M. Pharmacokinetics. Principles and applications. — N.-Y., Chicago, McGRAW-Hill, 2001. — 420 p.

559. Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г., Середенин С. Б. и др. Распределение ¹⁴C-феназепам и его метаболитов в печени, головном мозге и плазме крови при однократном и длительном введении препарата белым крысам // Фармакол. и токсикол. — 1980, № 2. — С. 144—147.

560. Зиньковский В. Г., А. Головенко Н. Я., Станкевич Е. Соответствие органов и тканей мышей центральному и периферическому отсекам кинетической модели, основанной на данных соотношения лекарство-метаболит в плазме крови и других тканях // Там же. — 1987. — № 6. — С. 65—68.

561. Небоут Т. Разработка лекарственных средств: от создания молекулы до готового препарата // Медиография. — 2000, 22. — № 1—2. — С. 9—16.

562. Стефанов О. В. (редактор). Доклінічні дослідження лікарських засобів. — Київ: Авіцена. — 2001. — 540 с.

563. Стефанов О. В. (редактор). Руководство по клиническим испытаниям лекарственных средств. — Киев: Авиценна. — 2001. — 426 с.

564. Prentis R. A., Lis V., Walker S. R. Pharmocetical innovation by the seven UK-owned pharmocetical companies (1964—1985) // Br. J. Clin. Pharmacol. — 1988, 25. — P. 387—396.

565. Товбина Ю. К. (редактор). Метод молекулярной динамики в физической химии. — М.: Наука, 1996. — 336 с.

566. Зоркий П. М. Структурная химия на рубеже веков // Рос. хим. ж. — 2001, Т. XLV. — № 2. — С. 3—10.

567. Головенко Н. Я. Биотрансформация физиологически активных веществ и лекарственных препаратов. В кн.: Экспериментальная и клиническая фармакокинетика. — Москва, 1988. — С. 111—123.

568. Brown F. Chemoinformatics: What is it and how does it impact drug discovery? // Annu. Rep. Med. Chem. — 1998, 33. — P. 375—384.

569. Drews J. Drug discovery today — and tomorrow // Drug Discov. Today. — 2000, 5. — P. 2—4.

570. Hrib N. J., Pect N. P. Chemoinformatics: are we exploiting this new science? // *Drug Discov. Today*. — 2000, 5. — P. 483—485.
571. Drewry D. N., Yong S. S. Approaches to the design of combinatorial libraries // *Chemon. Intell. Lab. Syst.* — 1999, 48. — P. 1—20.
572. Kim K. H., Brusniak M. K., Pearlman R. S. UniSur CoMFA: for stable and consistent 3D QSAR. In: *Rational molecular design in drug research*. — Copenhagen: Munksgaard, 1998. — P. 67—83.
573. Kristl A., Pecar S., Kmetec V. Are calculated log *P* values for some guanine derivatives by different computer programmes reliable? // *Int. S. Pharm.* — 1999, 181. — P. 219—226.
574. Ihlenfeldt W. D. Virtual reality in chemistry // *J. Mol. Model.* — 1997, 3. — P. 386—402.
575. Statistical molecular design of building blocks for combinatorial chemistry / Zinussan A., Gottfries J., Zindgren F., Wold S. // *J. Med. Chem.* — 2000, 43. — P. 1320—1328.
576. Головенко М. Я. Комбінаторна хімія: хемоінформатика // *Вісн. фармакол. та фармації*. — 2001. — № 10. — С. 11—14.
577. Филимонов Д., Поройков В., Каранчева И. и др. Компьютерное прогнозирование спектра биологической активности химических соединений по их структурной формуле: система PASS // *Эксперим. и клинич. фармакол.* — 1995. — № 2. — С. 56—62.
578. Раевский О. А. Дескрипторы молекулярной структуры в компьютерном анализе биологических активных веществ // *Успехи химии*. — 1999, 6. — С. 555—576.
579. *Experimental and computation approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings* / Lipinski C. A., Lombardo E., Dominy B. W., Feeney P. J. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* — 1997, 23. — P. 3—25.
580. Blake J. F. Chemoinformatics — predicting the physicochemical properties of «drug-like» molecules // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2000, 1. — P. 104—107.
581. Walters P. W., Murcko M. A. Library filtering systems and prediction of drug-like properties. In: *Virtual screening for bioactive molecules. Methods and principles in medicinal chemistry*. — Wiley-VCH., 2001. — V. 10. — P. 15—56.
582. Andriasano V., Bertucci C., Cavirini V. et al. Stereoselective binding of 2,3-substituted 3-hydroxypropionic acids on immobilized human serum albumin chiral stationary phase // *J. Chromatogr.* — 2000, 876. — P. 75—86.
583. Colmenarejo G., Alvarer-Pedraglio A., Lavanderg J. Chemoinformatic models to predict binding affinities to human serum albumin // *J. Med. Chem.* — 2001, 44. — P. 4370—4378.
584. Lewis D. Cytochrome P450: structure, function and mechanism. — Taylor and Francis, 1996. — 450 p.
585. Levis D. Structural characteristics of human P450 involved in drug metabolism: QSAR and lipophilicity profiles // *Toxicol.* — 2000, 144. — P. 197—203.

586. *Butina D., Segall M., Frankcombi K.* Predicting ADME properties in silico methods and models // DDT. — 2002, 7. — P. 83—88.
587. *Liorens O., Perez J.* Toward the design of chemical libraries for mass screening biased against mutagenic compounds // J. Med. Chem. — 2001, 44. — P. 2793—2804.
588. *Ashby J., Tennant R.* Definite relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemical tested by U. S. NTP // Mutat. Res. — 1991, 257. — P. 229—306.
589. *Beresford A., Selick H., Tarbit M.* The emerging importance of predictive ADME simulation in drug discovery // DDT. — 2002, 2. — P. 109—116.
590. *Panchagnula R., Thomas N.* Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research // Int. J. Pharmac. — 2000, 3. — P. 131—150.
591. *Головенко М. Я.* Біофармація та фармакокінетика // Вісн. фармакол. та фармації. — 2002, 2. — С. 9—16.
592. *Raevsky O. A.* Hydrogen bond strength estimation by means of HYBOT. — In.: Computer-Assisted Lead Finding and optimization. — Verlag, Basil, 1997. — P. 367—378.
593. *Abraham M., Ibrahim A., Zissimos A., et al.* Application of hydrogen bonding calculations in property based drug design // DDT, 2002, 20. — P. 1056—1063.
594. *Артеменко А. Г.* Анализ связи структура-свойство на основе молекулярных решеточных моделей: Дис. ... канд. хим. наук. — Одесса, 2000. — 145 с.
595. *Vedani A., Zbinden P., Snyder J. et al.* Psendoreceptor modeling: The construction of three-dimensional receptor surrogates // J. Am. Chem. Soc. — 1995, 117. — P. 4987—4994.
596. *Ландау М. А.* Молекулярные механизмы действия физиологически активных соединений. — М.: Наука, 1981. — 262 с.
597. *Hansch C.* On the structure of medical chemistry // J. Med. Chem. — 1976, 1. — P. 1—6.
598. *Баренбойм Г. М., Маленков А. Г.* Биологически активные вещества. Новые принципы поиска. — М.: Наука, 1986. — 363 с.
599. *Ghose A., Crippen G.* Geometrically feasible binding modes of a flexible ligand molecule at receptor site // J. Com. Chem. — 1985, 5. — P. 350—359.
600. *Moyna G., Mediwala S., Williams H., et al.* Simple algorithm for superposing sets of NMR derived structure. Its application to the conformational study of cephalomannine in lipophobic an lipophilic solution // J. Chem. Inf. Comput. Sci. — 1996, 36. — P. 1224—1227.
601. *Sheridan R., Kearsley S.* Why do we need so many chemical similarity search methods? // DDT, 17. — P. 903—911.
602. *Klebe G.* Comparative molecular similarity index analysis: CoMSIA // Perspect Drug Discovery Des. — 1998, 12. — P. 87—104.
603. *Stahl M.* Structure-based library design. In.: virtual screening for bioactive molecules. — Wiley-VCH, 2000. — P. 229—264.
604. *Головенко М. Я.* Комбінаторна хімія: віртуальний скринінг // Вісн. фармакол. та фармації. — 2001. — № 12. — С. 11—14.

605. *Zupan J.* Introduction to artificial neural network (ANN) methods: What they are and how use them // *Acta Chim. Slov.* — 1994, 41. — P. 327—352.
606. *Kovalishyn V., Tetko I., Luik A. et al.* Neural network studies. 3. Variable selection the cascade-correlation learning architecture // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* — 1998, 38. — P. 651—659.
607. *Нейронные сети как метод поиска зависимостей структура-свойство органических соединений* / Н. М. Гальберштам, И. И. Баскин, В. А. Палюлин, Н. С. Зефирова // *Успехи химии.* — 2003, 72 (7). — С. 706—727.
608. *Горбань А. Н.* Обучение нейронных сетей. — М.: Параграф, 1990. — 253 с.
609. *Livingstone D., Salt D.* Regression analysis for QSAR using neural networks // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* — 1992, 2. — P. 213—218.
610. *So S.-S., Karplus M.* Evolutionary optimization in quantitative structure-activity relationships: an application of genetic neural networks // *J. Med. Chem.* — 1996, 39. — P. 1521—1530.
611. *Jiang J., Wang J., Song X. et al.* Network training and architecture optimization by recursive approach and modified genetic algorithm // *J. Chemom.* — 1996, 10. — P. 253—267.
612. *Luke B.* Evolutionary programming applied to the development of quantitative structure-activity relationships and quantitative structure-property relationships // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* — 1994, 34. — P. 1279—1287.
613. *Vracko M.* A study of structure-carcinogenic potency relationships with artificial neural networks. The use of descriptors related to geometrical and electronic structures. — *Ibid*, 1997, 37. — P. 1037—1043.
614. *So S.-S., Karlus M. A.* comparative study of ligand-receptor complex binding affinity prediction methods based on glycogen phosphorylated inhibitors // *J. Comput. — Aided. Mol. Des.* — 1999, 13. — P. 243—258.
615. *Anzali S., Gasteiger J., Holzgrabe U. et al.* The use of self-organizing neural networks in drug design // *Perspect. Drug Discov. Des.* — 1998, 9. — P. 273—299.
616. *Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г.* Определение транквилизаторов 1,4-бенздиазепинового ряда и их метаболитов в биологических средах // *Хим.-фарм. журн.* — 1978, 12. — С. 3—14.
617. *Eglen R., Schneider G., Bohm H.* High-throughput screening and virtual screening: Etry points to drug discovery. In.: *Virtual screening for bioactive molecules.* — Wiley-VCH, 2000. — P. 2—14.
618. *Watt A., Morrison D., Evans D.* Approaches to higher-throughput pharmacokinetics (HTPK) in drug discovery // *DDT.* — 2000. — № 1. — P. 17—24.
619. *Harrison A., Walker D.* Automated 96-Well solid-phase extraction for the determination of doramectin in cattle plasma // *J. Pharm. Biomed. Anal.* — 1998, 16. — P. 777—783.
620. *Simpson H.* High throughput liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis using 96-Well disk solid phase extraction plate for the sample preparation // *Rapid Commun. Mass: Spectrom.* — 1998, 12. — P. 75—82.

621. *Marchese A.* DEtermination of pranlukast and its metabolites in human plasma by LC/MS/MS with PROSPEKT online solid-phase extraction // *J. Mass. Spectrom.* — 1998, 33. — P. 1071—1079.
622. *Frick L., Adikson K., Wells-Knecht K. J.* Cassete dosing: rapid *in vivo* assessment of pharmacokinetics // *Pharm. Sci. Tech. Today.* — 1998. — № 21. — P. 12—18.
623. *Spalding D., Harker A., Bayliss M.* Combining high-throughput pharmacokinetic screens at the hitstoleads stage of drug discovery // *DDT.* — 2000. — № 12 (suppl). — P. 970—976.
624. *Wilding T., Hirst P., Connour A.* Development of new engineering-based capsule for human drug absorption studies // *Pharmaceutical, Science and Technology Today.* — 2000. — № 11. — P. 385—392.
625. *Scherf U.* A gene expression database for a molecular pharmacology of cancer // *Nat Genet.* — 2000, 24. — P. 236—244.
626. *Тоцький В. М.* Генетика. — Одеса: Астропринт, 2002. — 710 с.
627. *Rininger G. A., Dipippo V. A., Gould-Rothbery B. E.* Differential gene expression technologies for identifying surrogate markers of drug efficacy and toxicity // *DDT.* — 2000, 5. — № 12. — P. 560—568.
628. *Harrington C. A.* Monitoring gene expression using DNA microarrays // *Curr. Opin. Microbiol.* — 2000, 3. — P. 285—291.
629. *Farr S.* Goncise review: gene expression applied to toxicology // *Toxicol. Sci.* — 1999, 50. — P. 1—9.
630. *Бажора Ю. И.* Фармакогенетика. Достижения и перспективы. — Одеса: Друк, 2000. — 139 с.
631. *Green C. D.* Open systems: panoramic views of expression // *J. Immunol. Meth.* — 2001. — № 22. — P. 73—79.
632. *Ziang P., Pardee A.* Differential display of eukariotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction // *Science.* — 1992, 257. — P. 967—971.
633. *Velculescu V. E.* Serial analysis of gene expression // *Science.* — 1995, 270. — P. 484—487.
634. *Hubank M.* Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA // *Nucl. Acids Res.* — 1994, 22. — P. 5640—5648.
635. *Zee P. S.* Genomic analysis // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2000, 11. — P. 171—175.
636. *Shimkets R. A.* Gene expression analysis by transcript profiling coupled to a gene database query // *Nat. Biotechnol.* — 1999, 17. — P. 798—803.
637. *Sutcliffe I. G.* TOGA: an automated parsing technology for analysing expression of nearly all genes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2000, 97. — P. 1976—1981.
638. *Heller R. A.* Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using DNA microarrays // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1997, 94. — P. 2150—2155.

639. *Геном человека и гены «предрасположенности»* / В. С. Баранов, Е. В. Баранова, Т. Э. Иващенко, М. В. Асеев. — СПб: Интермедика, 2000. — 210 с.

640. *Renz M.* Quantitative expression analysis of genes regulated by both obesity and leptin reveals a regulatory loop between leptin and pituitary — derived ACTH // *J. Biol. Chem.* — 2000, 275. — P. 10429—10436.

641. *FDA.* New labeling and use changes for resulin // FDA talk paper, 1999, June 16.

642. *Bailey D. S., Bondar A., Furness L. M.* Pharmacogenomics — it's not just pharmacogenetics // *Curr Opin. Biotechnol.* — 1998, 9. — P. 595—601.

643. *Whittaker P.* What is the relevance of bioinformatics to pharmacology? // *Trends in pharmacological sciences* — 2003, 24. — № 8. — P. 434—439.

644. *Зефиров Н. С., Гордеева Е. В.* Компьютерный синтез // *Успехи химии.* — 1987. — № 10. — С. 1753—1771.

645. *Hicham Feneri, Ed.* Combinatorial chemistry. — Oxford University Press, Inc., New York, 2000. — 476 p.

646. *Sucholeiki I., Ed.* High throughput synthesis. Principles and practice. — Marcel Dekker, New York, 2001. — 366 p.

647. *Bing Yan.* Analytical methods in combinatorial chemistry. Technomic Publishing company, Inc. — Lancaster, 2000. — 268 p.

648. *Coates W., Hunter D., Mc Lachlan W.* Successful implementation of automation in medicinal chemistry // *DDT*, 2000. — № 11. — P. 521—527.

649. *Houghten R., Pinilla C., Appel J., Blondelle S.* Mixture-based synthetic combinatorial libraries // *J. Med. Chem.* — 1999, 42. — № 19. — P. 3743—3778.

650. *Houghten R., Pinilla C., Appel J.* Blondelles. Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery // *Nature.* — 1991, 37. — P. 84—86.

651. *Furka A., Sebestyen F., Asgedom M., Dibo G.* General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures // *Int. J. Pept. Protein. Res.* — 1991, 37. — P. 487—493.

652. *Головенко М. Я.* Високопродуктивні технології вивчення та створення лікарських засобів. Синтез біологічно активних сполук // *Вісн. фармакол. та фармації.* — 2002. — № 3. — С. 2—8.

653. *Leone-Bay A., Freeman J., O'Tool D., Rosado-Gray C.* Studies directed at the use of a parallel synthesis matrix increase throughput in an *in vivo* assay // *J. Med. Chem.* — 2000, 43. — P. 3573—3576.

654. *Dooley C, Ny P., Bidlack I., Houghten R.* Selective ligands for the m, d and k opioid receptors identified from a single tetrapeptide positional scanning combinatorial library // *J. Biol. Chem.* — 1998, 273. — P. 18848—18856.

655. *Griffith M., Dooley C, Houghten R., Kiely J.* Solid-phase synthesis, characterization and screening of 43000 — compounds tetrahydroisoquinoline combinatorial library. In: *Molecular diversity and combinatorial chemistry: libraries and drug discovery.* — Washington, DC, 1996. — P. 50—57.

656. *Scott B., Siegmund A., Marlowe C., et al.* Solid-phase organic synthesis (SPOS): A novel route to diketopeperazine and diketomorpholines // *Mol. Diversity*. — 1995, 7. — P. 125—134.

657. *Ostresh J., Husar G., Blondelle S., et al.* «Libraries from libraries»: Chemical transformation of combinatorial libraries to extend the range and repertoire of chemical diversity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1994, 91. — P. 11138—11142.

658. *Breakthrough* of the year // *Science*. — 1998, 22. — P. 2156—2161.

659. *Coates W., Hunter D., MacLachlan W.* Successful implementation of automation in medicinal chemistry // *DDT*. — 2000, 5. — № 11. — P. 521—527.

660. *Cargill J., MacCuish N.* Object-relational databases; the next wave in pharmacological data management. — *DDT*. — 1998. — V. 33, 5. — P. 547—551.

661. *Головенко М. Я.* Лікарська токсикологія // *Вісн. фармакол. та фармації*. — 2002, 4. — С. 2—8.

С о д е р ж а н и е

Введение	3
Глава 1. Термодинамика	11
1.1. Термохимия	17
1.2. Критерии термодинамического равновесия	22
Глава 2. Растворы электролитов	27
2.1. Равновесия в водных растворах (в гомогенных системах)	32
2.1.1. Строение воды и ее свойства	34
2.1.2. Диссоциация слабых электролитов	40
2.1.3. Растворимость лекарств	44
Глава 3. Принципы комплементарности связывания лекарств биологическими макромолекулами	51
3.1. Силы, действующие между молекулами	59
3.2. Количественная оценка прочности связывания	68
3.3. Стереоспецифичность связывания лигандов с белками	74
3.4. Взаимодействие низкомолекулярных соединений с липидным бислоем мембран	82
Глава 4. Кинетика	86
4.1. Порядок реакции	91
4.2. Кинетика реакций, катализируемых ферментами	98
4.2.1. Ингибирование, активация и индукция ферментов	105
4.3. Молекулярные интерпретации фармакологических закономерностей в рамках принципов физической химии	112
Глава 5. Высвобождение субстанции из лекарственной формы	120
5.1. Распадаемость	125
5.2. Растворение	128
5.3. Взаимодействие лекарственных и вспомогательных веществ ...	130
Глава 6. Всасывание	138
6.1. Мембранные структуры клетки, определяющие кинетику трансцеллюлярного транспорта	142

6.2. Структура межклеточного контакта, определяющего парацеллюлярный транспорт веществ	146
6.3. Механизмы биотранспорта лекарственных средств	158
6.3.1. Пассивный транспорт	162
6.3.1.1. Простая диффузия	164
6.3.1.2. Облегченная диффузия	168
6.3.2. Активный транспорт	170
6.3.3. Структурно-функциональные свойства транспортных белков ...	175
6.3.3.1. Транспортные системы органических катионов (ОСТ)	178
6.3.3.2. Транспортные системы органических анионов (ОАТ)	180
6.3.3.3. Нуклеозид-переносщая система (NT)	181
6.3.3.4. Системы, выводящие из клеток лекарственные вещества	182
6.3.3.5. Сывороточный альбумин	188
6.3.4. Транспорт воды	193
6.3.5. Цитоз	196
6.4. Особенности всасывания лекарств, зависящие от пути их введения	199
6.4.1. Полость рта и желудочно-кишечный тракт	200
6.4.2. Кожа	206
6.4.3. Легкие	208
6.5. Интеграция ферментных и транспортных систем	210
6.6. Количественная оценка всасывания лекарств	214
6.6.1. Биодоступность	219
6.6.2. Биоэквивалентность	222
Глава 7. Распределение	225
7.1. Отсеки, определяющие специфику распределения лекарства в организме	228
7.2. Роль тканевых барьеров в распределении лекарств в организме	233
7.2.1. Барьерные механизмы центральной нервной системы	236
7.2.2. Гемато-офтальмический барьер	250
7.2.3. Плацентарный барьер	252
7.2.4. Субклеточное распределение лекарств	256
7.2.5. Объем распределения	258
Глава 8. Метаболизм	262
8.1. Окисление	267
8.1.1. Железопорфириновые ферменты	268
8.1.1.1. Цитохром Р450-зависимые монооксигеназы	269

8.1.1.1.1. Классификация изоформ цитохрома P450	273
8.1.1.1.2. Характеристика изоформ цитохрома P450, катализирующих метаболизм лекарств	283
8.1.1.2. Пероксидазы	292
8.1.1.3. Кatalаза	295
8.1.1.4. Ферментные свойства миоглобина и гемоглобина	297
8.1.1.5. Ферменты, катализирующие соокисление лекарственных средств	305
8.1.1.6. Гемоксигеназа	314
8.1.2. Флавинозависимая монооксигеназа	318
8.1.2.1. Тканевая и видовая специфичность FMO	319
8.1.2.2. Реакции и механизмы катализа	320
8.1.3. Молибденсодержащие ферменты	329
8.1.3.1. Ксантинооксидаза-ксантиндегидрогеназа	330
8.1.3.1.1. Субстратная специфичность и механизм действия	332
8.1.3.2. Альдегидоксидаза	336
8.1.4. Дегидрогеназы	342
8.2. Восстановление	349
8.2.1. Восстановление нитросоединений	350
8.2.2. Восстановление азосоединений	356
8.2.3. Восстановление N-окисей	358
8.2.4. Восстановление нитрозосоединений	360
8.2.5. Восстановление кетонов	360
8.2.6. Восстановление ароматических эпоксидов	363
8.2.7. Восстановительное дегалогенирование	364
8.2.8. Восстановление пиримидинов	366
8.3. Гидролиз	367
8.3.1. Эстеразы	368
8.3.2. Эпоксидгидролаза	376
8.3.3. Амидазы	379
8.3.4. β -Глюкуронидаза и сульфатаза	381
8.3.5. Некоторые реакции гидролитического расщепления лекарств, катализируемые ферментами неуставленной природы	384
8.4. Конъюгация	387
8.4.1. Уридиндифосфатглюкуронозилтрансфераза и другие ферменты, обеспечивающие синтез углеводных конъюгатов ..	388
8.4.1.1. Генетическая организация и тканевая специфичность UGT	393
8.4.1.2. Сопряженность реакций глюкуронирования лекарств с другими процессами биотрансформации	399
8.4.2. Сульфотрансфераза и фосфортрансфераза	405

8.4.3. Метилтрансферазы	409
8.4.4. Ацетилтрансферазы	411
8.4.5. Ферменты, катализирующие реакции конъюгации лекарств с аминокислотами и пептидами	417
8.4.6. Альтернативность путей реакций конъюгации лекарств в клетке	423
Глава 9. Элиминация лекарств	429
9.1. Почечная экскреция лекарств.....	431
9.1.1. Транспортные системы мембран канальцевых клеток	437
9.2. Желчная экскреция лекарств	445
9.3. Другие пути выведения лекарственных веществ.....	456
9.3. Количественная оценка элиминации лекарственных средств ...	458
Глава 10. Фармако-токсикологические аспекты ADME.....	462
10.1. Фармакогенетика	463
10.1.1. Генетическое разнообразие CYP450, катализирующих окисление лекарств	467
10.1.2. Генетическое разнообразие CYP450, катализирующих гидроксилирование эндогенных веществ	484
10.2. Биологическая активация лекарств	495
10.2.1. Продолжительность существования активных метаболитов ...	497
10.2.2. Модификация молекулы CYP450 ксенобиотиками	502
10.2.3. Механизмы индукции CYP450	508
10.3. Фармакокинетика	511
10.3.1. Основные модели фармакокинетики	515
10.3.1.1. Фармакокинетические параметры	517
10.3.1.2. Частевые линейные фармакокинетические модели	522
10.3.1.3. Нелинейные модели.....	528
Глава 11. Биологический ответ	530
11.1. Рецепторы	533
11.2. Взаимодействие лекарства с рецептором	538
11.3.1. Некоторые теории лекарство-рецепторного взаимодействия	540
11.3.2. Оккупационные модели рецепторно-лигандного комплекса ...	546
11.3.3. Аллостерические модели рецепторно-лигандного взаимодействия	549

11.4. Оптимизация действия лекарств на основании их терапевтических индексов и показателей комплекса «лекарство—рецептор»	558
11.5. Взаимосвязь между фармакодинамикой и фармакокинетикой (PD—PK)	566

Глава 12. Использование принципов и подходов

 физико-химической фармакологии в разработке новых лекарственных средств	576
12.1. Конструирование и скрининг биологически активных веществ ...	581
12.1.1. Прогнозирование био-физико-химических свойств веществ ..	586
12.1.2. Описание химической структуры веществ и биологической активности	590
12.1.3. Отнесение химических веществ к потенциально лекарственным	594
12.1.4. Прогнозирование дескрипторов межмолекулярных взаимодействий	603
12.1.5. Виртуальный скрининг фармакологического профиля действия лекарств	606
12.1.5.1. Виртуальный скрининг биологически активных веществ при известной структуре рецептора	608
12.1.5.2. Косвенные методы оценки комплементарности лигандов рецептору	610
12.1.6. Искусственные нейронные сети	615
12.2. Высокопродуктивные скрининговые технологии	620
12.2.1. ADME/PK — скрининговые технологии	621
12.2.2. Фармакогеномика и биоинформатика	627
12.2.2.1. Дифференциальная экспрессия генов	631
12.3. Высокопродуктивные технологии химии биологически активных веществ	643
12.3.1. Компьютерный синтез	645
12.3.2. Комбинаторная химия	649
12.3.3. Автоматизация синтетических процессов	660
Заключение	664
Приложение 1	669
Приложение 2	670
Литература	673

Наукове видання

ГОЛОВЕНКО Микола Якович

ФІЗИКО-ХІМІЧНА ФАРМАКОЛОГІЯ

Монографія

Російською мовою

Зав. редакцією *Т. М. Забанова*

Гол. редактор *Ж. Б. Мельниченко*

Технічні редактори *Р. М. Кучинська, О. В. Стадніченко*

Коректор *О. В. В'язовська*

Здано у виробництво 30.03.2004. Підписано до друку 14.08.2004.
Формат 60×84/16. Папір офсетний. Гарнітура «Літературна».
Друк офсетний. Ум. друк. арк. 41,85. Тираж 500 прим. Зам. № 245

Видавництво і друкарня «Астропринт»
(Свідоцтво ДК № 1373 від 28.05.2003 р.)
65026, м. Одеса, вул. Преображенська, 24.
Тел.: (0482) 26–98–82, 26–96–82, 37–14–25.

- Г61 Головенко М. Я.
Фізико-хімічна фармакологія: Монографія. — Одеса: Астро-
принт, 2004. — 720 с.
Рос. мовою.
ISBN 966 — 318 — 206 — 7.

У монографії висвітлюються питання всмоктування, розподілу, метаболізму, елімінації лікарських засобів та біологічної відповіді на їх введення (LADMER). Обґрунтовано поняття фізико-хімічної фармакології як наукового напрямку науки про ліки, об'єктом якого є структура, фізичні, хімічні та фізико-хімічні властивості біологічно активних речовин та їх мішеней. Встановлені загальні закономірності, дана кількісна оцінка і пояснені механізми реалізації процесів LADMER. Узагальнено основні принципи та методичні підходи, використовувані у фізико-хімічній фармакології для раціонального конструювання, скринінгу та синтезу нових (оригінальних) лікарських засобів.

Книга є уніфікованим посібником з вивчення лікарських засобів і ксенобіотиків.

Розраховано на фармакологів, токсикологів, біохіміків, фізіологів, патологів, лікарів, наукових співробітників, студентів і аспірантів хімічних, фармацевтичних, біологічних і медичних спеціальностей.



Головенко Николай Яковлевич, доктор биологических наук, профессор, академик АМН Украины. Заслуженный деятель науки и техники Украины, заведующий отделом физико-химической фармакологии Физико-химического института им. А.В. Богатского НАН Украины, заведующий лабораторией фармакокинетики Государственного фармакологического центра МЗ Украины, профессор кафедры фармацевтической химии Одесского национального университета им. И. И. Мечникова.

Народный депутат Украины, председатель подкомиссии по вопросам науки Верховного Совета Украины (1990—1994 гг.).

Автор 400 научных работ, среди которых 8 монографий, 5 методических пособий и рекомендаций, 25 патентов и авторских свидетельств. Подготовил 5 докторов и 22 кандидата наук. Член редакционных коллегий и советов научных журналов: «Ліки», «Клінічна фармація», «Досягнення біології та медицини», «Інтегративна антропологія», «Одеський медичний журнал», «Вісник психіатрії та психотерапії», «Современные проблемы токсикологии». Основные направления научной деятельности охватывают значительную часть проблем физико-химической фармакологии, вносящих существенный вклад в развитие теоретической и прикладной медицины. Исследования включают разработку химических и биологических основ взаимосвязи между структурой физиологически активных соединений и их фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ



Н. Я. Головенко