

ОГЛАВЛЕНИЕ

Авторский коллектив	7
Предисловие.....	9
Введение	12

ЧАСТЬ I

Глава 1. Классификация токсичных агентов и виды токсического действия.	16
1.1. Некоторые понятия, определения и термины, используемые в токсикологии.....	16
1.2. Что понимать под зависимостью структура—токсичность	20
1.3. Классификация токсичных агентов	26
1.4. Виды токсического действия.....	27
Глава 2. От генома к метаболу	50
2.1. Рецепторные комплексы как молекулярные мишени	50
2.2. Механизмы токсического действия и межклеточной коммуникации	63
2.3. Генный полиморфизм и индивидуальная химическая чувствительность. Метаболомика и метабономика.....	87
Глава 3. Метаболизм токсикантов (хемобиокинетика).	108
3.1. Транспорт токсикантов через биологические мембраны....	111
3.2. Резорбция токсикантов	116
3.3. Распределение токсикантов	125
3.4. Биотрансформация токсикантов.....	138
3.5. Выведение токсикантов	156
3.6. Вторичный метаболизм	164
Глава 4. Методология химико-токсикологического анализа.	169
4.1. Основные направления, цели и задачи химико-токсикологического анализа	169
4.2. Основные этапы химико-токсикологического анализа	173
4.3. Взаимосвязь между содержанием токсиканта в анализируемом биообъекте и интерпретацией результатов исследования	198
4.4. Особенности методологии клинико-токсикологического анализа	199
4.5. Особенности методологии химико-токсикологического анализа при определении наркотиков у живых лиц	201

4.6. Особенности интерпретации результатов химико-токсикологического анализа	213
4.7. Обеспечение качества и надлежащая лабораторная практика	219
Глава 5. Методы определения токсикантов	227
5.1. Введение	227
5.2. Иммунохимические методы определения токсикантов	229
5.2.1. Классификация и сущность иммунохимических методов	229
5.2.2. Иммуноферментные методы анализа	234
5.2.3. Принципы поляризационного флуороиммуноанализа	241
5.2.4. Иммунохимические методы определения наркотиков и лекарственных препаратов	251
5.3. Хроматографические методы определения токсикантов	269
5.3.1. Классификация, термины и определения	269
5.3.2. Хроматография в тонком слое сорбента	269
5.3.3. Газовая хроматография	283
5.3.4. Высокоэффективная жидкостная хроматография	308
5.3.5. Капиллярный электрофорез	315
5.3.6. Хроматографические методы с масс-спектрометрическим детектированием	328
5.4. Спектрометрические методы определения токсикантов	347
5.4.1. Классификация, термины и определения	347
5.4.2. Молекулярная спектрометрия	348
5.4.2.1. Спектроскопия в видимой и УФ-области спектра	348
5.4.2.2. Спектрометрия в ИК-области спектра, Раман-спектрометрия, ИК-Фурье-спектрометрия, методы НПВО и МНПВО	368
5.4.3. Атомная спектрометрия в элементном анализе токсикантов. Применение комбинированных систем: ВЭЖХ-ИСП-МС, ГЖХ-ИСП-МС, КЭ-ИСП-МС	390
5.4.4. Гамма-резонансная (Мессбауэровская) спектрометрия как инструмент нанотехнологий	403
5.4.5. Спектрометрия ядерного магнитного резонанса. Применение комбинированных систем ВЭЖХ-ЯМР и ВЭЖХ-ЯМР-МС в метаболомике и метабономике.	405
5.5. Электрохимические методы определения токсикантов	421

ЧАСТЬ II

Глава 6. Метаболизм и определение наркотических средств, психотропных и сильнодействующих веществ	425
6.1. Наркотическая и лекарственная зависимость. Основные понятия. Нормативные документы	425
6.2. Нейробиологические основы наркотической и лекарственной зависимости.	434
6.3. Основные группы наркотических средств, психотропных и сильнодействующих веществ.	449
6.3.1. Опиаты и опиоиды	449
6.3.2. Каннабиноиды.	459
6.3.3. Фенилалкиламины.	472
6.3.4. Кокаин	486
6.3.5. Галлюциногены	494
6.3.6. Тимолептики и тимеретики	505
6.3.7. Барбитураты	516
6.3.8. Производные 1,4-бензодиазепина.	529
6.3.9. Нейролептические средства	540
6.3.10. γ -Гидроксibuтират натрия.	553
6.3.11. Спайсы — синтетические каннабимиметики	559
Глава 7. Метаболизм и определение токсикантов различных химических групп.	568
7.1. Экспертиза алкогольного опьянения.	568
7.2. Органические соединения, относящиеся к группе летучих ядов	601
7.3. Ядовитые газы.	617
7.3.1. Оксид углерода(II)	617
7.3.2. Цианистый водород	625
7.3.3. Сероводород, оксиды азота	631
7.4. Пестициды.	634
7.4.1. Классификация пестицидов	634
7.4.2. Физико-химические свойства, метаболизм и токсичность	640
7.4.3. Методы определения.	666
7.5. Токсичные и эссенциальные элементы.	673
7.5.1. Главные факторы токсичности элементов. Металлолигандный гомеостаз	673
7.5.2. Химико-токсикологические характеристики элементов.	697

7.5.3. Выбор биообъектов для элементного анализа	700
7.6. Кислоты, основания, анионы солей	702
7.7. Фтор и его соединения	713
Глава 8. Допинговые средства	719
8.1. Основные допинговые средства	719
8.1.1. Анаболические агенты	721
8.1.2. Пептидные гормоны, факторы роста, связанные с ними субстанции и миметики	726
8.1.3. Бета-2-агонисты	729
8.1.4. Гормоны и модуляторы метаболизма	730
8.1.5. Диуретики и другие маскирующие вещества	732
8.1.6. Запрещенные методы	733
8.1.7. Субстанции, запрещенные во время соревнований ...	734
8.1.8. Терапевтические исключения	736
8.2. Особенности отбора образцов и проведения исследований в допинг-контроле	736
8.3. Методы исследования и интерпретация полученных результатов	742
8.3.1. Скрининговая методика определения допинговых средств	743
8.3.2. Исследование на присутствие анаболических стероидов	745
Глава 9. Экоотоксиканты	752
9.1. Экоотоксичность и экоотоксиканты	755
9.2. Стойкие органические загрязнители	766
9.3. Соединения металлов как экоотоксиканты	778
Глава 10. Биологическая опасность и биологический терроризм	789
10.1. Основные понятия	789
10.2. Природные токсины: источники, классификация, токсические и фармакологические эффекты, методы определения	793
Список основных сокращений	805
Список литературы	811
Предметный указатель	818

Глава 3

МЕТАБОЛИЗМ ТОКСИКАНТОВ (ХЕМОБИОКИНЕТИКА)

Настанет время, когда наши потомки
будут удивляться, что мы не знали
таких очевидных вещей.

*Луций Анней Сенека
Младший (4 г. до н.э.—65 г. н.э.)
древнеримский философ, поэт,
государственный деятель*

Термин **«метаболизм»** включает описание всех этапов (абсорбция, распределение, накопление, биотрансформация и выведение) пребывания токсиканта в организме (рис. 3-1), но не отражает временную зависимость течения любого из них. Термины «биотрансформация» и «метаболизм» не являются синонимами, хотя нередко в литературе их используют именно так. Б.А. Курляндским и В.А. Филовым был предложен новый термин — *хемобиокинетика* (кинетика химического

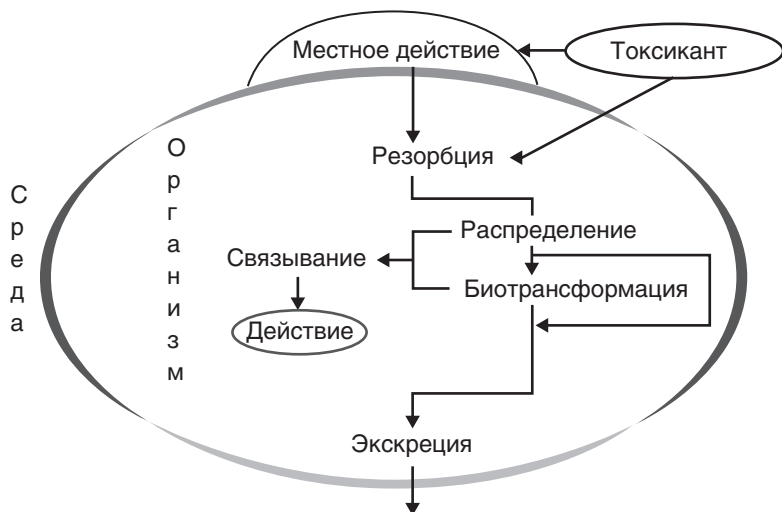


Рис. 3-1. Схема взаимодействия организм—токсикант

вещества в биологическом объекте). Согласно определению авторов, **хемобиокинетика** — это раздел токсикологии о путях поступления, механизмах всасывания, распределения, биотрансформации в организме и выведения токсичных химических веществ. Далее в тексте термины «метаболизм» и «хемобиокинетика» используются как синонимы.

Метаболизм токсикантов обусловлен генетически детерминированной биохимической индивидуальностью каждого человека, наследственный полиморфизм которого сформировался под влиянием постоянно протекающих в процессе эволюции мутаций генов и отбора. У человека существует генетический контроль над метаболизмом поступающих в организм химических соединений. Гены предрасположенности в зависимости от их роли в метаболических процессах и особенностей субстратов ферментативных реакций подразделяют на гены метаболизма, гены-триггеры (гены трансдукции, или переноса сигнала) и гены клеточных рецепторов. Понимание механизмов влияния генетических факторов на проявление токсического эффекта стало возможным лишь в связи с развитием методов молекулярной биологии и реализацией программы «Геном человека» (см. гл. 2).

Изучение механизмов формирования токсических эффектов при взаимодействии ксенобиотика с организмом и закономерностей проявления токсического процесса (см. гл. 2) является задачей **токсикодинамики** — одного из разделов токсикологии.

Токсикант и биообъект образуют сложную систему, которой присущи такие свойства, как иерархичность, незамкнутость, диссипация, неустойчивость, неравновесность и нелинейность.

Токсикокинетика (раздел токсикологии) изучает качественные и количественные закономерности поступления, резорбции (абсорбции), распределения, накопления, биотрансформации ксенобиотиков в организме и выведения продуктов их катаболизма. На токсикокинетические процессы влияют природа токсиканта, гистофизиологические и биохимические характеристики организма (табл. 3-1), что будет показано далее на конкретных примерах при изложении глав 6–10.

Главная задача токсикокинетики — установить, каким образом доза и способ воздействия вещества на организм влияют на развитие токсического процесса.

Ответ метаболических структур и морфофункциональных комплексов организма на химическую агрессию носит кооперативный (суммарный) характер, что связано с флуктуациями, вероятностью

появления бифуркаций¹ и образования диссипативных систем². Бифуркация (от лат. *bi* — двойной и *furca* — развилка) — термин, адекватно описывающий единичное событие, которое самым решающим образом сказывается на формировании будущего. Поэтому в токсикологии так важно понятие о *критических точках* — пороговых, эффективных и среднесмертельных дозах и концентрациях.

Таблица 3-1. Влияние природы токсиканта и свойств биологических структур организма на токсикокинетику вещества

Природа токсиканта	Свойства биологических структур организма
Химическое строение, см. п. 1.2, 1.4; гл. 4–10	Наличие в биоструктурах химических соединений, способных взаимодействовать с токсикантом, см. п. 2.1, 2.2
От размера молекулы токсиканта зависит способность вещества диффундировать через поры клеточных мембран и биологические барьеры	Свойства биологических барьеров Например: толщина, наличие и размер пор в различных мембранах; возможность обеспечения <i>пассивного или специфического транспорта</i> веществ и др., см. ниже
Липофильность токсиканта определяет его способность накапливаться в соответствующих средах, см. ниже	Липофильность биологических структур (соотношение воды и жира в клетках, тканях и органах) значительно различается, см. ниже
Соотношение при определенном значении pH ионизированных и неионизированных форм молекул токсиканта определяет способ его проникновения через биологические барьеры, см. ниже	Скорость протекания биохимических процессов в организме определяется рядом факторов, в том числе генетическими особенностями организма, см. п. 2.3 и ниже

Использование токсикокинетических характеристик вещества позволяет адекватно выбрать биообъект, подлежащий химико-токсикологическому анализу, правильно интерпретировать его

¹ В неравновесной термодинамике (естественной науке, занимающейся изучением динамики и эволюции систем в окружающем нас мире) термин «бифуркация» применяется для характеристики фундаментальной особенности поведения сложных систем, подверженных сильным воздействиям и напряжениям в неравновесных состояниях и условиях.

² Диссипативные системы — системы, полная энергия которых (сумма кинетической и потенциальной энергий) при движении убывает, переходя в другие виды энергии, например в теплоту, т. е. происходит диссипация энергии.

результаты, применить наиболее эффективный способ детоксикации. Токсикокинетические исследования необходимы при разработке новых лекарственных препаратов и при проведении их клинических испытаний.

Начиная с момента поступления ксенобиотика в организм и оканчивая выведением вещества или продуктов его метаболизма, происходят токсикокинетические процессы, которые можно разделить на три фазы. Это фазы резорбции (абсорбции), распределения и выведения вещества.

Фаза I — фаза *резорбции*, или *абсорбции*, — характеризуется проникновением вещества в кровь. В течение этой фазы концентрация вещества в крови постоянно возрастает и достигает максимума. Фаза II (α -фаза) — фаза *распределения* вещества по органам и тканям в основном за счет кровотока — характеризуется максимальным эффектом воздействия токсиканта. Концентрация вещества в плазме крови заметно снижается, в том числе за счет процессов биотрансформации. В течение фазы III (β -фазы) осуществляется *выведение* вещества или его метаболитов из организма. В этот период скорость уменьшения концентрации вещества в плазме крови снижается.

3.1. ТРАНСПОРТ ТОКСИКАНТОВ ЧЕРЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

Познание истины есть
посвящение в тайны бытия.

*Николай Александрович Бердяев (1874–1948),
русский философ-экзистенциалист, социолог*

Я наполняю сердце тишиной —
в ней скрыто множество ответов.

*Клод Моне (1840–1926),
известный французский художник*

Общепризнанна жидкостно-мозаичная модель мембраны клетки, предложенная Сингером и Николсоном (1972). В липидный бислой мембраны встроены молекулы гликопротеинов, определяющие ее тип и свойства, в частности проницаемость для химических веществ (см. ниже табл. 3-7). Переход веществ через биологические мембраны осуществляется путем пассивного или специфического транспорта.

1. Пассивный транспорт:

- пассивная диффузия (свободная диффузия через липидные мембраны по градиенту концентрации и диффузия по градиенту концентрации через поры — ионные каналы размером 0,3–0,4 нм);
- фильтрация.

Пассивная диффузия. Скорость диффузии вещества через мембрану является функцией градиента концентрации. При этом большое значение имеют:

- площадь поверхности мембраны;
- толщина мембраны;
- константа диффузии токсиканта.

Константа диффузии токсиканта зависит от его липофильности, молекулярной массы, пространственной конфигурации и степени диссоциации (в случае слабого электролита).

Процесс пассивной диффузии описывается уравнением Фика. Пассивная диффузия происходит в направлении падения концентрации вещества, ведет к равномерному распределению вещества по всему занимаемому им объему, не требует затрат энергии и возможна в обоих направлениях (как в клетку, так и из нее). С ростом молекулярной массы вещества коэффициент диффузии заметно снижается. Через биологические мембраны могут проходить молекулы жирорастворимых веществ, воды и некоторых низкомолекулярных гидрофильных соединений.

Липофильные токсиканты свободно диффундируют через мембрану. С увеличением растворимости веществ в липидах их проницаемость через биологические барьеры растет, но, достигнув определенного уровня, резко снижается. Вещества с очень высокой липофильностью не проникают через мембрану, а накапливаются в ней.

Гидрофильные токсиканты не могут беспрепятственно преодолеть липидный барьер мембраны. Транспорт таких молекул возможен благодаря мембранным белкам, формирующим в липидном слое водные каналы (поры), и определяется размерами транспортируемой молекулы, но не зависит от коэффициента распределения в системе масло/вода. Если диаметр молекулы больше диаметра пор, то она не проникает через мембрану. Диффузия через поры также описывается уравнением Фика, но под диффузионной поверхностью понимая эффективную площадь пор.

Для всех ионизированных молекул, независимо от размера, липидная мембрана плохо проницаема или совсем непроницаема. Величина

заряда иона имеет большее значение, чем его размер, что обусловлено как взаимодействием иона токсиканта с зарядами белковых молекул на стенках канала, так и его гидратацией в водной среде. Проницаемость мембран для двухзарядных ионов хуже, чем для однозарядных, так как степень гидратации тем выше, чем больше заряд (так, трехзарядные ионы не преодолевают биологические барьеры).

Для транспорта токсикантов, являющихся слабыми органическими кислотами и основаниями, большое значение имеет величина их pK_a (см. гл. 1). Недиссоциированные молекулы таких веществ проникают через липидные мембраны и поры в соответствии с величиной коэффициента распределения в системе масло/вода. Ионы, образовавшиеся при диссоциации молекул таких веществ, через липидный бислой и поры не диффундируют.

Фильтрация — это процесс прохождения жидкости и растворенных в ней веществ с малыми размерами молекул через пористые мембраны под действием гидростатического или осмотического давления. Она осуществляется в капиллярном отделе кровеносного русла (капилляры проницаемы для низкомолекулярных веществ), в гломерулярном аппарате почек (образование первичной мочи) (см. гл. 1). Большинство токсикантов экскретируется из организма путем фильтрации (см. ниже).

2. Специфический транспорт:

- активный транспорт;
- облегченная диффузия (прохождение через барьеры по градиенту концентрации с помощью специфических белков-переносчиков);
- прохождение через барьеры путем цитозов.

Активный транспорт веществ через мембрану осуществляется против градиента концентрации или градиента электрохимического потенциала, требует затраты энергии и протекает в одном направлении. Известны специфические транспортные системы как для эндогенных веществ, так и для ксенобиотиков. Транспортные белки и гликопротеины играют важнейшую роль в регуляции абсорбции, распределения и экскреции многих токсикантов. Примеры — *P*-гликопротеин, основной функцией которого является энергозависимый (за счет гидролиза АТФ) трансмембранный транспорт многих веществ; пептиды — переносчики органических катионов и анионов, играющие важную роль в поступлении токсикантов в печень, и др.

Процесс, при котором энергия АТФ непосредственно расходуется на перемещение молекулы или иона через мембрану, — это *первичный*

активный транспорт. Известно четыре типа таких процессов, которые называют *ионными насосами*:

- Na^+/K^+ -АТФаза;
- Ca^{2+} -АТФаза;
- H^+/K^+ -АТФаза;
- H^+ -АТФаза.

Принцип действия ионных насосов аналогичен работе специализированных белков-переносчиков, встроенных в мембрану — пермеаз. Механизм работы пермеазы заключается в специфическом связывании переносимого вещества на внешней поверхности мембраны, последующего фосфорилирования с помощью АТФ и изменения конформации пермеазы, в результате чего переносимое соединение оказывается внутри клетки. Белки ионного насоса могут находиться в двух конформациях. Например, в одной конформации белок связывает три иона натрия, в другой — два иона калия.

Вторичный активный транспорт включает два транспортных механизма:

- первичную активно-транспортную систему (например, транспорт Na^+ , нуждающийся в энергии АТФ);
- сопряженный процесс облегченной диффузии другого вещества в противоположном направлении (например, транспорт аминокислот).

Облегченная диффузия — это процесс прохождения молекул вещества через барьеры по градиенту концентрации с помощью специальных белков-переносчиков. Этот процесс специфичен и протекает с более высокой скоростью, чем пассивная диффузия. Скорость транспорта веществ облегченной диффузией зависит от трансмембранного градиента концентраций переносимого вещества, скорости связывания вещества переносчиком на одной поверхности мембраны, от количества белков-переносчиков в мембране, скорости их конформационных изменений, в результате которых вещество переносится через мембрану (например, с внешней поверхности) и высвобождается на другой поверхности мембраны (например, внутренней). После уравнивания концентрации вещества по обе стороны мембраны процесс транспорта прекращается. В отличие от активного транспорта облегченная диффузия *не требует затрат энергии*.

При облегченной диффузии, как и в процессе активного транспорта, возможен *котранспорт* — транспорт иона или молекулы, сопряженный с переносом другого иона.

Прохождение через барьеры путем *цитозов*¹ включает *эндоцитоз*, *экзоцитоз*, *транскитоз*, *синцитоз* и *интрацитоз*.

Эндоцитоз. Макромолекулярные комплексы или корпускулярный материал (например, частицы металлической, асбестовой или угольной пыли, чужеродные и отмирающие собственные клетки организма, крупные вирусы, бактерии и др.) клетка захватывает с помощью *фагоцитоза* — явления поглощения и переваривания клетками корпускулярных частиц. Везикула размером в несколько микрометров, содержащая частицы, отделяется от клеточной мембраны и переносится в цитоплазму.

Капли жидкости и растворенные в ней вещества, окруженные клеточной мембраной, образуют везикулы диаметром около 0,1 мкм и захватываются клеткой (*пиноцитоз*).

Рецептор-обусловленный эндоцитоз — высокоспецифичный и независимый от концентрации токсиканта процесс — состоит из нескольких этапов. Рецепторы эндоцитоза представляют собой глико- и липопroteины, липофильная часть которых связана с липидной мембраной, а гидрофильные части обращены внутрь и наружу клетки (например, акроглобулиновый/липопroteиновый рецептор — *LRP*, выполняющий функции основного рецептора эндоцитоза). Вначале молекулы транспортируемого вещества (лиганда) взаимодействуют с липофильной частью рецептора, расположенной на внешней поверхности мембраны. При этом часть рецептора, которая находится в цитоплазме клетки, взаимодействует со специализированным белком, называемым адаптином (*adaptine*).

Полученный комплекс лиганда, рецептора и белка мигрирует в определенную зону мембраны, на которой уже сконцентрировались другие аналогичные комплексы, окаймленные специализированным белком — клатрином (*clathrin*), играющим одну из главных ролей при образовании везикул. На следующем этапе «окаймленные ямки», находящиеся на мембране, втягиваются в клетку, отделяются от мембраны, образуя везикулы. Находясь внутри клетки, везикула практически сразу теряет клатриновую оболочку и адаптины. Далее разрушается комплекс лиганда с рецептором, который встраивается

¹ Эндоцитоз — захват вещества клеткой (фагоцитоз, пиноцитоз, рецептор-обусловленный эндоцитоз). Экзоцитоз — выделение веществ из клетки. Транскитоз — транспорт вещества через объем клетки. Синцитоз — слияние клеток или слияние клеток с липидными везикулами, содержащими вещество. Интрацитоз — образование везикул и их слияние внутри клетки.

обратно в структуру клеточной мембраны, т. е. осуществляется рециркуляция рецептора, а лиганд, попав во внутреннюю среду клетки, целенаправленно доставляется к ядру, аппарату Гольджи или другим органеллам, не смешиваясь с другими макромолекулами клетки. Путем рецептор-обусловленного эндоцитоза в клетку поступают высокомолекулярные вещества, регулирующие ее метаболизм (например, гормоны, факторы роста, трансферрин, липопротеины низкой плотности и др.), а также проникают некоторые токсины белковой природы (например, тетанотоксин, ботулотоксин, см. гл. 10).

Экскрецию макромолекул из клетки во внеклеточное пространство называют *экзоцитозом*.

Трансцитоз — специализированный транспорт, характерный для некоторых типов клеток (например, эпителиальных), — объединяет признаки рецептор-обусловленного эндоцитоза и экзоцитоза при участии фузогенных (от лат. *fusio* — слияние) мембранных белков. Везикула транспортируется через внутриклеточное пространство к противоположной мембране и выделяет свое содержимое во внеклеточное пространство (например, сосуды).

В главах 6–10 при рассмотрении свойств отдельных токсикантов даны пояснения о преобладающем механизме транспорта.

3.2. РЕЗОРБЦИЯ ТОКСИКАНТОВ

Истинный химик должен быть не только практиком и теоретиком, он должен быть философом.

*Михаил Васильевич Ломоносов (1711–1765),
первый крупный русский ученый-естествоиспытатель,
энциклопедист, физик, химик, астроном, поэт,
основатель Московского университета*

В организм токсиканты могут поступать *энтеральным* (перорально с последующим всасыванием в ЖКТ) и *парентеральным* путями. Парентеральные пути поступления ксенобиотиков разнообразны (внутривенный, внутриартериальный, внутримышечный, трансдермальный, ингаляционный и др.).

По своим физико-химическим свойствам большое количество веществ способно как к местному, так и к *резорбтивному*, или *системному*, действию. При внутривенном или внутриартериальном введении токсикант сразу и полностью попадает в кровоток. Если вещество