

УДК 541.4:(541.6+615.9)

## Прогноз опасности веществ по зависимости структура—биотрансформация—активность

З. И. Жолдакова, Н. В. Харчевникова

*ЗОЯ ИЛЬНИЧНА ЖОЛДАКОВА — доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией комплексного эколого-гигиенического нормирования НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина РАМН. Область научных интересов: охрана окружающей среды, токсикология, прогноз токсичности и опасности химических веществ.*

*НИНА ВЕНИАМИНОВНА ХАРЧЕВНИКОВА — кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории комплексного эколого-гигиенического нормирования НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина РАМН. Область научных интересов: квантовая химия в изучении механизма действия и токсичности химических веществ, количественные соотношения структура-токсичность.*

119992 Москва, Погодинская ул., д.10/15, стр. 1, тел. (095)246-71-73, факс (095)245-03-41,  
E-mail kharchevnikova\_n@mail.ru

Изучение биологической активности и, в частности, токсичности химических веществ для человека и животных — длительный и дорогостоящий процесс, связанный с проведением экспериментов, которые подчас противоречат международным требованиям гуманного отношения к животным. Поэтому на протяжении уже нескольких десятилетий ведется поиск альтернативных методов оценки токсичности и опасности химических веществ. Одним из наиболее перспективных подходов в решении этой проблемы является изучение зависимости структура—активность вещества.

Развивая это направление, исследователи прошли путь от поиска связи между токсичностью и такими простыми параметрами, как физико-химические константы вещества (температура кипения, молекулярная масса и др.) [1], до использования универсальных характеристик химической структуры (параметры, отражающие электронное строение молекул) и прогноза в рамках метода Ханча [2, 3]. Однако методические подходы в этой области были ограничены из-за недостатка знаний о механизме взаимодействия веществ с организмом на молекулярном уровне. В частности, не осознавалось, что в ходе биотрансформации образуются высокорекреационноспособные короткоживущие соединения и конечные метаболиты, более опасные, чем исходные вещества.

Стадии механизма токсического действия и физико-химические показатели, характеризующие каждую стадию биотрансформации, были систематизированы в работе [4] при изложении патогенетической модели интоксикации. На первой стадии происходит абсорбция вещества и транспорт его через липидные биомембраны и гидрофильные структуры клеток к активному центру, на котором происходит биотрансформация вещества или его взаимодействие с рецептором. На этом этапе важны такие свойства веществ, как гидрофобность, растворимость, объем и площадь поверхности молекулы. Эти параметры используются для построения моделей неспецифического действия, так называемых базовых моделей. Базовая токсичность, определяемая по этим моделям, соответствует случаю, когда биологический эффект зависит в основном от

дозы вещества, дошедшей до активного центра, а не от различий в природе и скорости химического взаимодействия на этом центре.

Вторая стадия — это высокоспецифичная реакция, протекающая с участием ферментов и приводящая к биотрансформации вещества. На третьей стадии осуществляется взаимодействие образовавшихся в ходе биотрансформации продуктов или интермедиатов (короткоживущих промежуточных соединений) с биомолекулами. На этой же стадии возможно взаимодействие с биомолекулой-мишенью самого вещества, обуславливающее его токсическое действие. Таким образом, развитие интоксикации организма может быть вызвано взаимодействием как с самим веществом, так и с продуктами его биотрансформации. Токсичность на второй и третьей стадиях может быть описана с помощью параметров, характеризующих реакционную способность ксенобиотиков. Выбор параметров определяется тем, какая стадия взаимодействия вещества с организмом является ключевой, т.е. такой, на которой небольшие изменения химической структуры в ряду родственных веществ приводят к большой разнице в их токсичности.

Прежде чем перейти к рассмотрению количественной зависимости между структурой и активностью ксенобиотиков при их биотрансформации, определим само понятие «биотрансформация».

Биотрансформация — это биохимический процесс, в ходе которого вещества превращаются под действием ферментных систем организма. Этот процесс называют также метаболизмом или детоксикацией. Вместе с тем в точном понимании метаболизм — это усвоение организмом вещества в качестве продукта питания и источника энергии. Очевидно, что далеко не все чужеродные химические вещества могут играть эту роль, хотя их биотрансформация осуществляется в результате тех же химических реакций и с участием тех же ферментных систем, что и биотрансформация продуктов питания и эндогенных веществ [5—7].

Если чужеродные химические вещества липофильны, то они легко подвергаются биотрансформации с переходом в форму, облегчающую их выведение из организма. Поэтому в течение многих лет процесс

превращения веществ в организме рассматривался только как позитивное явление, направленное на уменьшение токсичности ксенобиотиков, а случаи увеличения токсичности считались исключением (процесс биотрансформации с увеличением токсичности получил название «летальный синтез»). В рамках таких представлений термин «детоксикация» был вполне оправдан. Однако с течением времени накопилась информация о том, что повышение токсичности в результате биохимических превращений веществ — скорее правило, чем исключение. Поэтому термин «биотрансформация» более универсальный, чем понятия «метаболизм» и «детоксикация».

Биотрансформация является важнейшей составляющей механизма хематокинеки и представляет собой сложный многостадийный процесс. Биохимические механизмы метаболизма и токсического действия подробно описаны в [5–15]. При исследовании взаимодействия вещества с организмом, в частности, механизмов токсического действия чаще всего изучается воздействие химических веществ на активность ферментов, их индукция и ингибирование [6, 8, 16]. Меньше внимания уделялось механизмам биотрансформации. Экспериментальные и теоретические исследования процессов биотрансформации включают биологические эксперименты *in vitro* и *in vivo*, в ходе которых с помощью методов аналитической химии (газожидкостная хроматография, хромато-масс-спектрометрия и др.) идентифицируются продукты биохимических превращений, а также их аддукты с биомолекулами. На основании данных этих исследований строятся гипотезы о механизме биотрансформации и механизме токсического действия.

Общепринято процесс биотрансформации подразделять на две фазы [5, 6, 12, 13]. На первой фазе биотрансформации осуществляются реакции с участием ферментов монооксигеназной системы цитохрома Р-450. Цитохром Р-450 действует как терминальная оксидаза и катализирует внедрение одного атома молекулы кислорода в субстрат, в результате чего образуется гидроксильный продукт, т.е. продукт, содержащий полярную ОН-группу и более гидрофильный, чем исходное соединение. Второй атом кислорода идет на образование молекулы воды с участием электронов, донорами которых выступает НАДФ·Н. В результате реакций первой фазы ксенобиотики становятся субстратами реакций второй фазы биотрансформации, в ходе которой они превращаются в еще более гидрофильные вещества. Под действием различных цитозольных или связанных с мембранами ферментов происходит присоединение (конъюгация) гидрофильных групп к полярным группам молекул ксенобиотиков или продуктов первой фазы биотрансформации. Ферментные системы, под действием которых происходит биотрансформация веществ в организме, подробно описаны в токсикологической и биохимической литературе [5–16].

В ходе реакций биотрансформации возможно превращение исходных ксенобиотиков в более реакционноспособные соединения, которые могут образовывать ковалентные связи с биомолекулами. Этот процесс мы называем биоактивацией [17, 18].

Анализ литературных данных [5–14] о биохимических процессах взаимодействия веществ с фермент-

ными системами и теоретических работ, посвященных моделированию процессов биотрансформации [10, 14, 30], позволил систематизировать реакции биоактивации в соответствии с их механизмом.

### Первая фаза биотрансформации

Наиболее универсальной реакцией первой фазы под действием монооксигеназной ферментной системы цитохрома Р-450 является гидроксильное. В зависимости от структуры ксенобиотика механизм реакции может быть различным.

В случае ароматических углеводородов С-гидроксильное протекает через стадию присоединения к активному центру фермента с образованием ареноксидов в качестве промежуточных продуктов (см. пример ниже на схеме 1). При этом реакцией, запускающей процесс биотрансформации, является, в частности, для производных бензола образование интермедиата типа  $\sigma$ -комплекса, содержащего тетраэдрически координированный атом углерода.

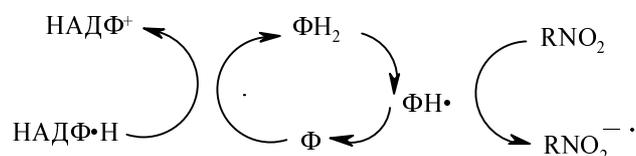
Гидроксильное алифатических соединений осуществляется через стадию образования свободных радикалов за счет отрыва атома водорода. Этот тип реакций характерен для биотрансформации алифатических углеводородов, алифатических нитрилов, диалкилнитрозаминов, замещенных аминов, галогенсодержащих алифатических соединений и др.

Для арилминов характерно N-гидроксильное. Предполагают, что N-гидроксильное осуществляется путем внедрения кислорода в связь N—H с образованием арилгидроксиламинов.

Другой реакцией на первой фазе биотрансформации является эпоксилирование. Реакция характерна для ненасыщенных углеводородов и их галогензамещенных производных, а также полициклических ароматических углеводородов. Изучение кинетического изотопного эффекта, а также квантовохимические расчеты свидетельствуют о радикальном механизме процесса. На первом этапе активная окисляющая частица фермента присоединяется к одному из атомов углерода, связанных двойной связью, с образованием триплетного бирадикала, затем происходит изменение спинового состояния интермедиата и образуется эпоксид.

По типу восстановительного дегалогенирования осуществляется биотрансформация галогенсодержащих алканов. В анаэробных условиях вместо присоединения кислорода к фермент-субстратному комплексу цитохрома Р-450 происходит быстрый перенос электрона на субстрат. При этом от алкилгалогенида отщепляется галогенид-анион и образуются галогеналкильные радикалы.

Еще одна реакция — восстановление — характерна для ароматических нитрозамещенных соединений. Она осуществляется под действием ферментов нитроредуктаз с участием НАДФ·Н и флавопротеинов (Ф). При этом сначала образуются анион-радикалы  $\text{RNO}_2^-$ .



Затем происходит диспропорционирование анион-радикалов с регенерацией нитросоединений и образованием нитрозосоединений:



На следующей стадии осуществляется восстановление нитрозосоединений с образованием аминосоединений и затем электрофильных интермедиатов — фенолигидроксиламинов и ионов арилнитрения.

### Вторая фаза биотрансформации

В результате конъюгации продуктов биотрансформации первой фазы с глутатионом под действием глутатион-S-редуктазы могут образовываться высокоактивные промежуточные соединения, например эписульфониевые ионы, способные алкилировать ДНК, как в случае конъюгации 1,2-дигалогенуглеводородов [19, 20].

Процесс конъюгации может протекать за счет O-ацетилирования. Так, под действием ацетилтрансферазы из N-гидроксиариламинов (N-фенилгидроксиламинов) образуются N-ацетоксиариламины — высокоакционные соединения, из которых в результате ферментативного гетеролитического расщепления образуются нитрениевые ионы [21–23].

Сульфатная конъюгация характерна для некоторых ариламинов. Известно, что N-сульфоэфиры 2-ацетиламинофлуорена проявляют гораздо более высокую биологическую активность, в частности канцерогенность и мутагенность, чем исходные вещества [17, 21].

Возможна также глюкуроновая конъюгация. Так, в результате исследований с применением ингибиторов уридиндифосфоглюкуронозилтрансферазы показано, что нефротоксичность сельскохозяйственного фунгицида N-(3,5-дихлорфенил)сукцинимид обусловлена образованием глюкуроновых конъюгатов метаболита этого соединения — N-(3,5-дихлорфенил)-2-гидрокси-сукцинимид. Этинилэстрадиол также подвергается биотрансформации с образованием токсичных N-глюкуроновых конъюгатов [24, 25].

Основанное на результатах биохимических экспе-

риментов представление о том, какая стадия механизма взаимодействия вещества с организмом является ключевой, а также приведенная выше систематизация процессов биоактивации в соответствии с их механизмом дают возможность выделить параметры, которые можно использовать для построения количественных соотношений структура—биотрансформация—токсичность.

Если ключевой стадией механизма токсического действия является взаимодействие ксенобиотика с рецептором, то для выявления искомой закономерности необходимо знать параметры, характеризующие электронное строение и реакционную способность самого вещества. Если же экспериментально установлено, что токсичность вещества определяется биоактивацией с образованием высокорекреационноспособных короткоживущих интермедиатов, то целесообразно рассчитать параметры процесса, моделирующего реакцию их образования. Из-за сложности структуры биомолекул при построении соотношений структура—активность приходится использовать параметры, характеризующие упрощенные модельные химические реакции для описания более сложных биохимических взаимодействий. Так, в рамках оксеноидной модели действия монооксигеназы для нахождения соотношений структура—активность рассчитывают параметры модельной реакции химических веществ с атомарным кислородом [31, 33].

В случае биоактивации с образованием устойчивых высокотоксичных метаболитов используются параметры, характеризующие электронное строение и реакционную способность этих метаболитов.

В табл. 1 приведены примеры выбора параметров в зависимости от ключевой стадии взаимодействия вещества с организмом.

Изложенный подход, основанный на учете механизма биотрансформации и применении методов вычислительной химии, был использован для получения соотношений структура—активность для соединений различных структурных классов [17, 18, 26–29]. Обзор зарубежных работ дан в [10, 14, 30]. Этот подход был применен для описания зависимостей смертельных и

Таблица 1

Электронные параметры структуры, необходимые для построения количественных соотношений структура—токсичность

Ключевая стадия взаимодействия вещества с организмом	Параметры	Примеры рядов и видов эффектов
Взаимодействие вещества с рецептором	Индексы реакционной способности исходных веществ*	Токсичность полихлорированных дибензо- <i>n</i> -диоксинов, полихлорированных дифенилов за счет взаимодействия с A <sub>h</sub> -рецептором
Образование короткоживущих интермедиатов при биоактивации	Характеристики модельной реакции биоактивации: энергия активации, разность полных энергий или теплот образования интермедиата и исходного вещества	1. Общая токсичность замещенных бензолов 2. Общая токсичность ароматических аминов 3. Мутагенность и метгемоглобинобразующая активность ароматических аминов 4. Общая токсичность алифатических нитрилов
Образование устойчивых метаболитов более токсичных, чем исходные вещества, при биоактивации	Индексы реакционной способности метаболитов	1. Канцерогенность и мутагенность полициклических ароматических углеводородов 2. Мутагенность алифатических галогенсодержащих соединений с короткой цепью

\* Индексы реакционной способности включают заряды на атомах, энергии граничных молекулярных орбиталей и их разности, электронные плотности на атомах на граничных орбиталях молекул и т.п.

пороговых эффектов, мутагенного и канцерогенного эффектов, метгемоглинообразующей активности, нефротоксичности и других видов биологической активности от структуры вещества. Возможности метода проиллюстрируем на некоторых примерах.

Для ряда соединений, известных как высокостабильные, — полихлорированных дибензо-*n*-диоксинов, полихлорированных дибензофуранов и полихлорированных дифенилов — токсичность обусловлена взаимодействием с цитозольным A<sub>h</sub>-рецептором. Способность полихлорированных дибензо-*n*-диоксинов вызывать индукцию монооксигеназ коррелирует с энергией высшей заполненной орбитали молекул этих соединений [14], канцерогенность коррелирует с поляризуемостью молекул, т.е. биологическая активность определяется характеристиками исходных соединений. Подробно механизм биологической активности и опасности этого класса соединений изложен в обзоре [10].

Примером биоактивации с образованием короткоживущих высокорекреационноспособных интермедиатов является биоактивация замещенных бензолов в процессе гидроксилирования под действием цитохрома P-450, которое проходит через стадию образования ареноксидов [14] (схема 1). Предполагается, что зависимости скорости этого процесса, положения замещения в бензольном кольце и токсичности замещенных бензолов от природы заместителя могут быть описаны с использованием энергетического параметра  $\Delta E$  — разности полных энергий промежуточного ареноксидного интермедиата I, содержащего тетраэдрически координированный атом углерода, и исходной молекулы замещенного бензола [14]. Для проверки этой гипотезы по программе MOPAC 6.0 в рамках метода MNDO для 58 замещенных бензолов были рассчитаны энергии молекул исходных соединений и интермедиатов, образуемых при присоединении кислорода ко всем возможным положениям замещения в бензоль-

ном кольце. При расчете интермедиатов геометрия метаболизируемого кольца принималась такой же, как в интермедиате превращения бензола, структура которого взята из работы [31]. Геометрия заместителей считалась такой же, как в исходной молекуле. Сопоставление результатов расчетов с данными по метаболизму химических соединений, взятых из базы данных Metabolite [32], показало, что гидроксилирование в биосистемах осуществляется преимущественно в тех положениях, для которых энергия  $\Delta E$  меньше (совпадение с экспериментом 90%). Для 20 соединений, для которых в литературе имеются количественные данные по интенсивности метаболизма *in vitro*, получена достоверная зависимость количества образующихся фенолов от параметра  $\Delta E$  [33].

Получена также достоверная зависимость острой токсичности (среднесмертельные дозы и концентрации) от параметра  $\Delta E_{\min}$ :

$$\lg \text{LD}_{50} (\text{мг/кг}) = 1,64 + 1,23 \Delta E_{\min}$$

(коэффициент корреляции  $r = 0,78$ , количество соединений в выборке  $n = 25$ , достоверность  $p < 0,001$ )

$$\lg \text{LK}_{50} (\text{мг/м}^3) = 4,55 + 0,93 \Delta E_{\min}$$

$$(r = 0,93, n = 23, p < 0,001)$$

Показано, что чем меньше значение параметра  $\Delta E_{\min}$ , т.е. чем устойчивее интермедиат и, следовательно, чем легче он образуется, тем токсичнее соединение [14, 33].

Модель на основе этого параметра была применена также для прогноза безопасного уровня хронического воздействия — максимально недействующих доз (МНД) для замещенных бензола со сложными заместителями (дифенил, хлорированные дифенилы, дифениловые эфиры, дифенилметан и др.) [34]:

$$\lg \text{МНД} = -2,76 + 1,95 \Delta E_{\min}$$

$$(r = 0,91, n = 13, p < 0,001)$$

Еще одним примером является биоактивация алифатических нитрилов, в ходе которой происходит отщепление CN<sup>-</sup>-иона [35].

Действие на человека некоторых алифатических нитрилов — соединений, содержащих CN-группу, вызывает те же симптомы и признаки токсичности, что и действие цианидов. Экспериментально установлено, что цианиды образуются в ходе метаболизма алифатических нитрилов. Было высказано предположение, что под действием цитохрома P-450 происходит гидроксилирование атома углерода, находящегося в  $\alpha$ -положении к CN-группе, с образованием неустойчивого циангидрина, который в результате ферментативной реакции дисмутации разлагается с образова-

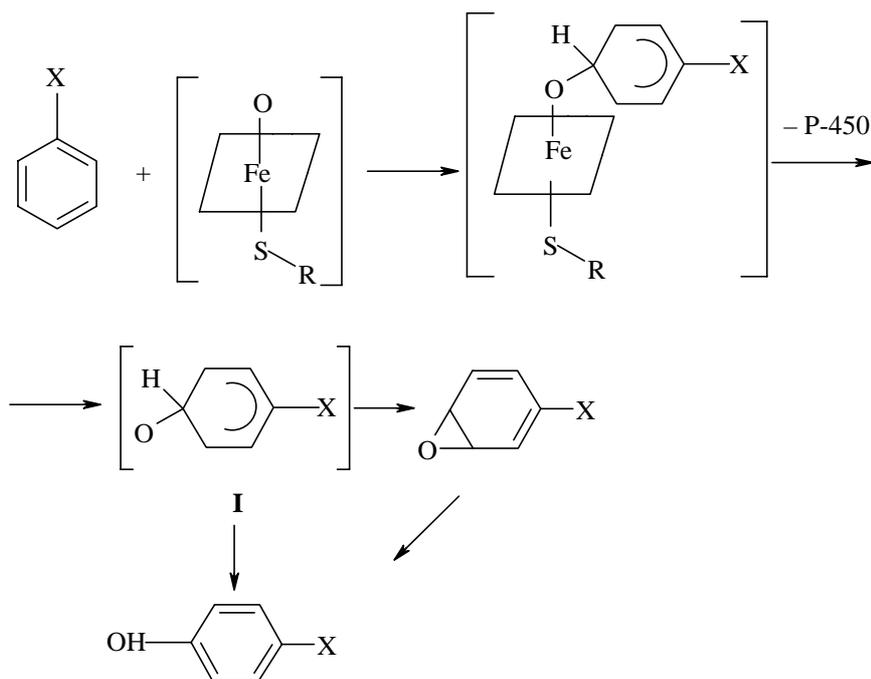


Схема 1

нием карбонильного соединения и выделением цианистого водорода, что и определяет токсический эффект (схема 2).

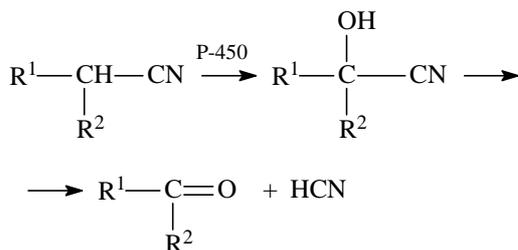


Схема 2

В работе [35] получена достоверная зависимость структура—биотрансформация—острая токсичность в ряду алифатических нитрилов. Авторы основывались на высказанном ранее предположении о том, что гидроксирование под действием цитохрома P-450 представляет собой радикальный процесс, и стадия образования радикала  $\text{R}^1\text{R}^2\text{C}\cdot\text{CN}$  является лимитирующей.

В [35] использована модель цитохрома P-450, несколько отличная от оксеноидной. В качестве модели активной окисляющей частицы цитохрома P-450 принимали не атомарный кислород, как в оксеноидной модели монооксигеназ, а *n*-нитрозофенокси-радикал [36]. Для оценки энергии активации реакции отрыва водорода от атома углерода алифатических соединений использовали соотношение:

$$\Delta H^* = 2,60\Delta H_r + 2,38I$$

где  $\Delta H_r$  — энтальпия реакции исходного соединения с *n*-нитрозофенокси-радикалом с образованием *n*-нитрозофенола и радикала  $\text{R}^1\text{R}^2\text{C}\cdot\text{CN}$ , рассчитанная методом АМ1; *I* — потенциал ионизации радикала.

Расчет электронных характеристик радикалов проводили с использованием гамильтониана неограниченного метода Хартри—Фока.

Для 26 алифатических нитрилов были рассчитаны энтальпии активации для реакций образования радикалов при отрыве водорода от всех атомов углерода нитрилов. По уравнению Аррениуса были рассчитаны константы скорости  $k_n$  соответствующих реакций. При расчете температуру принимали равной 37 °С и считали, что изменение энтропии активации с изменением температуры пренебрежимо мало. Гидроксирование всех атомов углерода, кроме α-атома, приводит к детоксикации нитрила. Поэтому в качестве параметра для соотношений структура—битрансформация—токсичность использовали константу скорости реакции отрыва водорода от α-углерода  $k_\alpha$ , умноженную на корректирующий коэффициент, учитывающий гидроксирование других положений:

$$k_{\alpha\text{согг}} = k_\alpha [A k_\alpha / (A k_\alpha + B k_\beta + C k_\gamma + N k_n)]$$

где *A*, *B*, *C*, *N* — число атомов водорода у атомов углерода α, β, γ, *n*.

Для прогноза острой токсичности алифатических нитрилов было получено следующее регрессионное уравнение:

$$\lg(1/\text{ЛД}_{50}) = -0,16\lg P^2 + 0,22\lg P + 0,11\ln k_{\alpha\text{согг}} + 6,65$$

( $r = 0,90, n = 26, p < 0,001$ )

Поскольку в выборке содержались соединения с алифатической цепью различной длины и, следовательно,

обладающие различной гидрофобностью, в уравнение введена квадратичная зависимость от логарифма коэффициента распределения октанол/вода  $\lg P$ .

Токсическое действие ароматических аминов определяется биоактивацией. Механизм биоактивации достаточно хорошо изучен [17, 37—39] (схема 3).

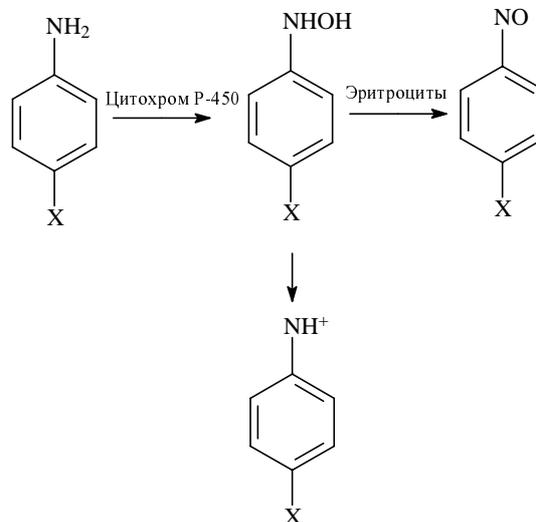


Схема 3

На основании этой схемы была выдвинута гипотеза, что зависимости структура—мутагенная активность и структура—метгемоглобинообразующая активность ароматических аминов могут быть описаны с использованием одного энергетического параметра  $\Delta(\Delta H_f)$ , характеризующего относительную устойчивость двух последовательных метаболитов, образующихся в ходе биоактивации через N-окисление, — арилгидроксиламинов и нитрениевых ионов [28]. При расчете параметра  $\Delta(\Delta H_f)$  за нуль принята разность теплот образования фенолгидроксиламина и фенолнитрениевого иона. Вид полученных уравнений свидетельствует о том, что как мутагенная, так и метгемоглобинообразующая активность аминов зависят от этого параметра, и эти зависимости разнонаправлены:

$$\lg(1/D_{mut}) = -1,65 - 0,15\Delta(\Delta H_f)$$

( $r = 0,82, n = 10, p < 0,01$ )

$$\% \text{MtHb} = 66,9 + 5,03\Delta(\Delta H_f)$$

( $r = 0,91, n = 10, p < 0,01$ )

где  $D_{mut}$  (мкм на чашку) — доза вещества, вызывающая удвоение числа колоний ревертантов (мутировавших бактерий) в тесте Эймса на штамме TA100 *S. typhimurium*; %MtHb — процент метгемоглобина в крови, определяемый после введения внутривенно (кошкам) вещества в дозе 0,25 моль/кг.

Чем устойчивее нитрениевый ион относительно арилгидроксиламина, тем больше способность ариламина вызывать мутагенный эффект, и тем менее сильным метгемоглобинообразователем он является.

В некоторых случаях с помощью энергетического электронного параметра можно определить, является ли данное соединение активным или неактивным. Так, с применением метода линейного дискриминантного анализа показано, что ароматические амины могут быть разделены на обладающих мутагенной

активностью на бактериях и неактивных по значению одного параметра — энергии высшей заполненной молекулярной орбитали. Соединения, для которых значение этого параметра выше определенной величины, обладают активностью, остальные — неактивны. Полученные результаты интерпретированы как определение минимальных энергетических требований, обеспечивающих протекание процесса биоактивации соединения через N-окисление, поскольку энергия высшей молекулярной орбитали характеризует способность соединений к окислению [18]. В [29] определен параметр, позволяющий отделить ароматические амины, обладающие метгемоглобинообразующей активностью от неактивных, — энергия высшей заполненной молекулярной орбитали метаболитов (N-фенилгидроксиламины). Этот параметр связан с энергетическими требованиями процесса биохимического окисления N-фенилгидроксиламинов в нитрозосоединения, в ходе которого гемоглобин переходит в метгемоглобин (см. схему 3).

Развиваемый подход позволяет получать зависимости не только для специфических и неспецифических реакций организма, но и для видов специфических эффектов, в частности канцерогенного. Определяющая роль биотрансформации в канцерогенной активности полициклических ароматических углеводородов и их производных и ее механизм были установлены в результате большого числа экспериментальных и теоретических работ, обзор которых дан в [14].

Реакции, лежащие в основе биоактивации полициклических ароматических углеводородов, представлены на схеме 4 на примере бенз[а]пирена. На первом этапе соединения подвергаются эпоксицированию под действием монооксигеназной ферментной системы. Затем под действием эпоксидгидролазы образуются диолы, которые при последующем эпоксицировании превращаются в диолэпоксиды. Диолэпоксиды способны образовывать аддукты с ДНК, атакуя нуклеофильные позиции ДНК по мономолекулярному механизму нуклеофильного замещения ( $S_N1$ ) с образованием в качестве интермедиатов триолкарбокатионов. Образование триолкарбокатионов является ключевой стадией, лимитирующей скорость образования аддуктов и всего процесса канцерогенеза [14, 40]. Отсюда следует, что канцероген-

ное действие полициклических ароматических соединений будет тем сильнее, чем меньше требуется энергии для образования катиона из диолэпоксидов.

Стабильность карбокатионов относительно диолэпоксидов может быть рассчитана методом Хюккеля. Из всех карбокатионов, которые могут генерироваться в результате биотрансформации полициклических ароматических углеводородов, наиболее легко образуется катион, для которого разность энергии  $\Delta E$  молекул диолэпоксидов и карбокатиона наименьшая. Отметим, что образование карбокатиона из диолэпоксидов сопровождается увеличением размеров сопряженной  $\pi$ -системы за счет формирования одной дополнительной  $\pi$ -связи.

Алгоритм нахождения наиболее устойчивого карбокатиона из всех возможных представлен на схеме 5 (значения параметра  $E$  даны в  $\beta$ , где  $\beta$  — резонансный интеграл, параметр метода Хюккеля).

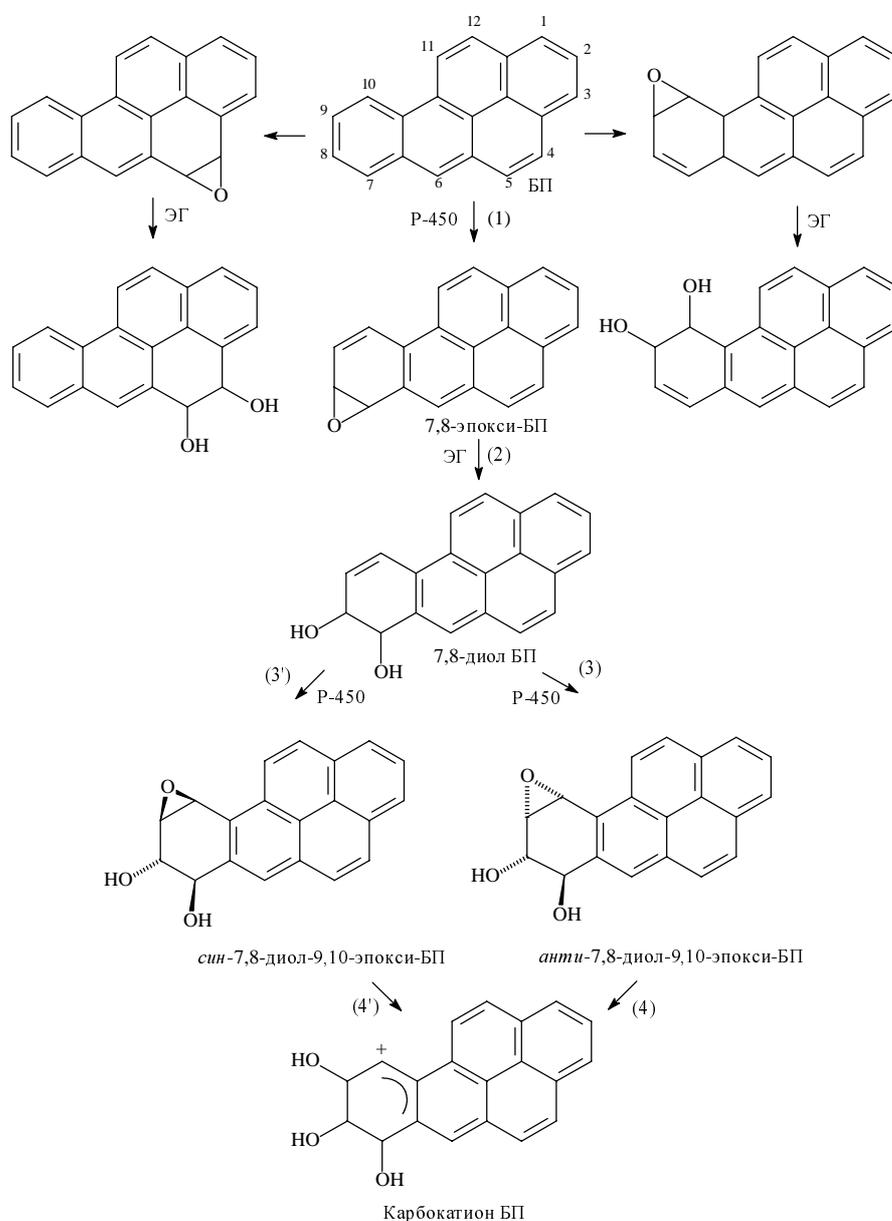


Схема 4

(БП — бенз[а]пирен, ЭГ — эпоксидгидролаза, P-450 — цитохром P-450)

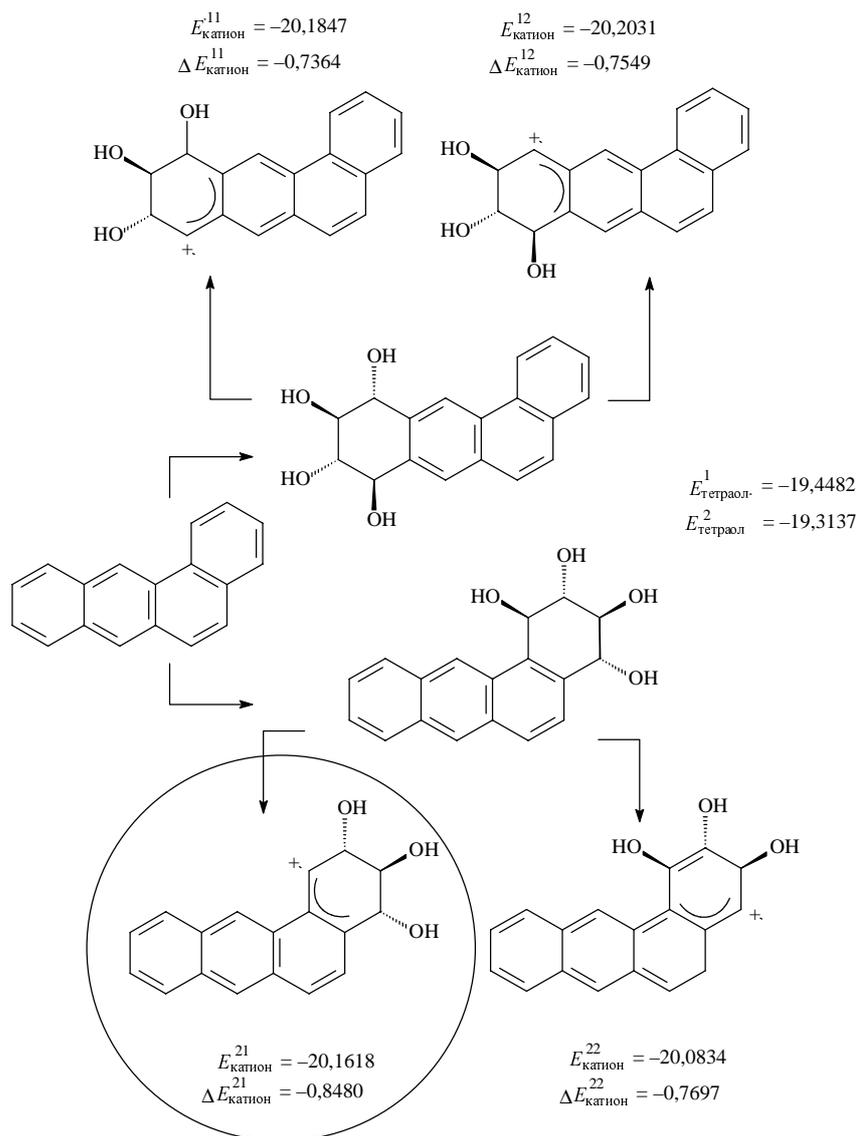


Схема 5

В ряду полициклических ароматических углеводов с ростом устойчивости соответствующего карбокатиона возрастает канцерогенная активность соединения. Однако имеются и исключения. Так, активность «линейных» полициклических углеводов типа тетрацена и соединений, включающих систему из трех расположенных в ряд бензольных колец, меньше, чем предсказывается моделью. Это не позволяет построить достоверные количественные зависимости структура—активность. Наличие исключений объясняется возможностью реакций дезактивации для таких соединений.

В связи с этим для построения модели структура—активность нами был использован комплексный подход, сочетающий анализ энергетических параметров типа  $\Delta E$  (см. выше), характеризующих ключевую стадию биотрансформации, и логико-комбинаторный метод, позволяющий найти сходство в структурах молекул, обладающих определенным уровнем активности. Алгоритм определения наиболее устойчивого карбокатиона полициклических ароматических угле-

водородов путем расчета разности энергий катиона и молекулы диолэпоксида в рамках метода Хюккеля был положен в основу одной из программ, включенных в версию (разработанной в отделе теоретических и прикладных проблем информатики ВИНТИ) интеллектуальной логико-комбинаторной ДСМ-системы правдоподобных рассуждений, предназначенной для прогноза токсичности, канцерогенности, мутагенности химических соединений [41].

ДСМ-система основана на логике Джона Стюарта Милля. Она позволяет прогнозировать проявление определенных заданных свойств в объектах, а также объяснять этот прогноз. В работе системы выделяются три уровня. На первом уровне — уровне сходства — задаются структура данных об объектах из определенной предметной области и операция сходства, сопоставляющая два объекта с третьим, выражающим их сходство. На втором уровне — уровне правил — объекты делятся на положительные примеры (обладающие некоторым интересующим нас свойством А) и отрицательные примеры (данным свойством не обладаю-

шие). При этом выделяются все сходства всех положительных примеров, не являющиеся сходствами отрицательных примеров (а также, возможно, проверяются некоторые дополнительные условия), что позволяет называть эти сходства гипотезами о причинах наличия свойства А в положительных примерах. На третьем уровне — уровне рассуждений — составляются стратегии, т.е. последовательности применений правил правдоподобного вывода и проверок некоторых условий для исходных данных и получения гипотез, что помогает сделать вывод об обоснованности применения правил правдоподобного ДСМ-вывода. На этом уровне можно получить некоторые гипотезы, основанные на правдоподобном выводе, сделанном путем дедуктивного подхода. Обычно (в рамках традиционной модели «структура—активность») при изучении свойств химических веществ с использованием ДСМ-системы в качестве модели объекта берется структурная формула вещества, записанная в виде графа или фрагментарного кода суперпозиции подструктур (ФКСП). Каждый дескриптор ФКСП — это группа атомов в некотором окружении. Если такая группа встречается в соединении, то значение соответствующей позиции в векторе кода ФКСП для данного вещества есть и с т и н а [42].

Предложенный комплексный подход был использован при разработке ветви системы, предназначенной для прогноза канцерогенности полициклических ароматических углеводородов. Система предоставляет возможность работы в различных режимах: 1) прогноз с поиском сходства на структурах исходных соединений без учета числовых параметров; 2) прогноз с поиском сходства на структурах исходных соединений с учетом числовых параметров, причем в случае прогноза канцерогенности полициклических ароматических углеводородов числовой параметр (энергетическая характеристика реакционной способности метаболитов — диолэпоксидов) рассчитывается системой, а в случае прогноза наличия специфических эффектов (канцерогенности) соединений других структурных классов числовые параметры рассчитываются по квантовохимическим программам (программный пакет МОРАС 6.0); 3) прогноз с поиском сходства на структурах конечных метаболитов, которые генерируются системой, с учетом числовых параметров. Канцерогенность полициклических ароматических углеводородов характеризуют по Бэджеру: (–) означает отсутствие канцерогенной активности, (+) — слабо активен,

(++) — довольно активен, (+++) — очень активен, (++++) — чрезвычайно активен.

Система была протестирована с использованием данных по канцерогенной активности 50 полициклических ароматических углеводородов. Была уточнена группа канцерогенности трех соединений, для которых имелись противоречивые экспериментальные данные. По результатам одних экспериментов соединения были отнесены к одной группе (по Бэджеру), а по результатам других экспериментов — к другой группе. Такие результаты описываются, например, как +/- . В соответствии с индексами Бэджера ДСМ-эксперимент проводился по четырем «свойствам»:

1. Соединение (по крайней мере) слабоактивно.
2. Соединение (по крайней мере) обладает средней активностью.
3. Соединение (по крайней мере) сильноактивно.
4. Соединение сверхактивно.

В табл. 2 приведены экспериментальные оценки канцерогенной активности соединений («свойства»), рассчитанные значения числового параметра  $\Delta E$  (в единицах  $\beta$ ) и результаты компьютерного ДСМ-эксперимента по определению уровня канцерогенной активности.

Анализ результатов свидетельствует, что учет числового параметра дает возможность уточнить прогноз канцерогенной активности соединений, доопределить «свойства» сильной и сверхсильной активности. С использованием комбинированного подхода был сделан прогноз канцерогенной активности для 14 неизученных (по канцерогенной активности) соединений [45].

Теоретически и экспериментально обоснованные количественные соотношения структура—биотрансформация—активность подтверждают наличие определенного механизма токсического действия. Они позволяют выделить вещества, для которых данный механизм нехарактерен, дать количественную оценку выраженности эффекта, отделить активные соединения от неактивных, прогнозировать механизм и количественные характеристики биологической активности неизученных веществ.

Предложенный подход, как и любой другой, имеет свои ограничения. Одно из них связано со сложностью процессов, обуславливающих токсический эффект. Одновременно с моделируемым процессом биоактивации могут идти и другие процессы, в частности процесс детоксикации. Еще одно ограничение касается не только изложенного подхода, но и других мето-

Таблица 2

Экспериментальные оценки канцерогенной активности соединений, значения числового параметра  $\Delta E$  и результаты компьютерных экспериментов

Соединение	Эксперимент				$\Delta E, \beta$	Компьютерный эксперимент в режиме поиска сходства на структурах исходных соединений							
	Свойства					без учета числового параметра				с учетом числового параметра			
						Свойства				Свойства			
	1	2	3	4		1	2	3	4	1	2	3	4
Бенз[e]пирен	+/-	-	-	-	0,826	+	?	?	?	+	-	-	-
Дибенз[a,c]антрацен	+/-	-	-	-	0,833	+	?	?	?	+	-	-	-
Дибензо[a,e]пирен	+	+	+/-	+/-	0,846	+	+	?	?	+	+	-	-

дов поиска количественных соотношений структура—активность. Опыт разработки таких соотношений свидетельствует о том, что прогноз показателей острой токсичности дает лучшие результаты, чем прогноз параметров хронической токсичности и менее требователен к выбору параметров. Это обусловлено тремя причинами. Во-первых, среднесмертельные дозы и концентрации, в отличие от показателей хронической токсичности, являются статистически обоснованными величинами. Во-вторых, природа процессов, определяющих хроническую токсичность, гораздо сложнее, чем процессов, вызывающих острую токсичность. В отличие от острой токсичности, хроническая токсичность развивается с участием адаптационно-приспособительных реакций организма с подключением новых ферментных и функциональных систем, процессов накопления вредных эффектов и биоаккумуляции. И наконец, особенности постановки эксперимента по определению пороговых и безвредных уровней химического фактора определяют дискретный характер этих величин, что, строго говоря, не позволяет применять регрессионный анализ для их прогноза. Перспективным направлением является объединение анализа числовых параметров, характеризующих реакционную способность, с логико-комбинаторными методами типа ДСМ, в которых анализ проводится на основе структурных субфрагментов молекул или их метаболитов. Такое объединение дает возможность учитывать многообразие и сложность процессов, происходящих в организме.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Голубев А.А., Люблина Е.И., Толоконцев Н.А., Филов В.А. Количественная токсикология. Л.: Медицина, 1973, 287 с.
2. Hansch C.A. Accounts Chem. Res., 1969, v. 2, p. 232.
3. Hansch C., Leo A. Substituents constants for correlation analysis in chemistry and biology. New York: Wiley, 1979.
4. Жолдакова З.И., Гусев Е.Н. Гигиена и санитария, 1987, № 7, с. 9.
5. Голиков С.Н., Саноцкий И.В., Тиунов Л.А. Общие механизмы токсического действия. Л.: Медицина, 1986, 286 с.
6. Метаболизм ксенобиотиков в организме животных и человека. Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Токсикология, 1981, т. 12, 157 с.
7. Саприн А.Н. Успехи биологической химии, 1991, т. 32, с. 146.
8. Метелица Д.И. Активация кислорода ферментными системами, М.: Наука, 1982, 256 с.
9. The bioactivation of foreign compounds. Ed. M.W. Anders. New York: Academic Press Inc., 1985.
10. McKinney J.D. Environmental Health Persp., 1996, v. 104, p. 810.
11. Frontiers of biotransformation, London: Tailor and Francis. Eds. K. Ruckpaul, H. Rein. 1990.
12. Парк Д.В. Биохимия чужеродных соединений. М.: Медицина, 1973, 287 с.
13. Selectivity and molecular mechanisms of toxicity. Eds. F. De Matteis, E.A. Lock. New York: McMillan, 1987.
14. Дьячков П.Н. Квантовохимические расчеты в изучении механизма действия и токсичности чужеродных веществ. Итоги науки и техники ВИНТИ. Сер. Токсикология, 1990, т. 16, 280 с.
15. Филов В.А. Взаимодействие организма и ксенобиотика: хемобиокинетика. В кн.: Общая токсикология. Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова М.: Медицина, 2002, с. 32.
16. Ляхович В.А., Цырлов И.Б. Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков. Новосибирск: Наука, 1981, 230 с.
17. Жолдакова З.И., Харчевникова Н.В. Вестник РАМН, 2002, № 8, с. 44.
18. Жолдакова З.И., Харчевникова Н.В. Количественная зависимость между структурой и активностью ксенобиотиков при их биотрансформации. В кн.: Общая токсикология. Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. М.: Медицина, 2002, с. 76.
19. Ketterer B., Taylor J.B. Glutathione transferases. In: Frontiers of biotransformation, v. 2. Principles, mechanisms and biological consequences of induction (Eds. K.Ruckpaul, H.Rein), London: Tailor and Francis, 1990, p. 234.
20. Lag M., Omichinski J.G., Dybing E. e. a. Chem.-Biol. Interact., 1994, v. 93, p. 73.
21. Langner A., Borchert H., Hein D.W., Pfeifer S. Postoxidation enzymes. In: Frontiers of biotransformation. V. 2. Principles, mechanisms and biological consequences of induction (eds. K.Ruckpaul, H.Rein), London: Tailor and Francis, 1990, p. 150.
22. Timbrell J.A. Acetylation and its toxicological significance. In: Metabolism of xenobiotics. Eds. J.W. Goreod, H. Oeschlager, J. Caldwell. London: Tailor and Francis, 1988, p. 249.
23. Weber W.W., Levy G.N., Hein D.W. Acetylation In: Conjugation reactions in drug metabolism. Ed. G.J. Mulder. London: Tailor and Francis, 1990, p. 163.
24. Mackenzie P.I. Structure and regulation of UDP glucuronosyltransferases. In: Frontiers of biotransformation. V. 2. Principles, mechanisms and biological consequences of induction. Eds. K. Ruckpaul, H. Rein. London: Tailor and Francis, 1990, p. 213.
25. Mulder G.J., Coughtrie M.W.H., Burchell B. Glucoronidation. In: Conjugation reactions in drug metabolism. Ed. G.J. Mulder. London: Tailor and Francis, 1990, p. 51.
26. Харчевникова Н.В., Жолдакова З.И. Гигиена и санитария, 2000, № 1, с. 25.
27. Харчевникова Н.В., Жолдакова З.И., Журков В.С. Вестник РАМН, 1997, № 7, с. 8.
28. Харчевникова Н.В., Жолдакова З.И., Журков В.С. Гигиена и санитария, 1998, № 4, с. 62.
29. Харчевникова Н.В., Жолдакова З.И. Там же, 1997, № 3, с. 41.
30. Richards A.M. Toxicology Letters, 1995, v. 79, p. 115.
31. Korzekwa K., Trager W., Loew G.H. J. Am. Chem. Soc., 1995, v. 107, p. 4273.
32. Metabolite Database. MDL Information Systems, Inc., 14600 Catalina Street, San Leandro, CA, USA (<http://www.mdli.com>).
33. Кузнецов А.В. Молекулярная биология, 1990, т. 23, вып. 5, с. 1373.
34. Жолдакова З.И., Харчевникова Н.В., Кустова Е.В., Синицына О.О. Экология человека, 1996, № 3, с. 16.
35. Grogan J., De Vito S.C., Korzekwa K.R. e. a. Chem. Res. Toxicol., 1992, v. 5, p. 548.
36. Korzekwa K.R., Jones J.P., Gillette J.R. J. Am. Chem. Soc., 1990, v. 112, p. 7042.
37. Carcinogenic and mutagenic responses to aromatic amines and nitroarenes. Ed. C.M. King. New York: Elsevier, 1988.
38. Gorrod J.W., Manson D. Xenobiotica, 1986, v. 16, № 10, p. 933.
39. Sabbioni G. Chem.-Biol. Interactions, 1992, v. 81, p. 91.
40. Jerina D.M., Sayer J.M. e. a. In: Carcinogenesis: fundamental mechanisms and environmental effects. Ed. B. Pullman. 1980, p. 1.
41. Финн В.К. Итоги науки и техники. Сер. Информатика, т. 15, М.: ВИНТИ, 1991.
42. Блинова В.Г., Добрынин Д. А. Язык ФКСП. Научно-техническая информация. Сер. 2, 2001, вып. 6, с. 14.
43. Маневич С.И., Харчевникова Н.В., Дьячков П.Н. Научно-техническая информация. Сер. 2, 2000, вып. 5.
44. Максин М.В., Харчевникова Н.В. Научно-техническая информация. Сер. 2., 2002, вып. 6, с. 25.
45. Максин М.В., Харчевникова Н.В. Научно-техническая информация. Сер. 2, 2003, вып. 11, с. 35.