

О. Б. Лысенко, А. В. Бухал, Л. В. Лысенко

ЗАВИСИМОСТЬ НАКОПЛЕНИЯ ТЯЖЕЛЫХ ИЗОТОПОВ УГЛЕРОДА И ВОДОРОДА В БИОСИСТЕМАХ ОТ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Предполагается, что повышенная техногенная нагрузка вносит коррективы в изотопные соотношения биогенных элементов. Было проведено обследование больных с патологическими изменениями разной этиологии. Зафиксировано наличие изотопного сдвига углерода в сторону увеличения содержания его тяжелого изотопа, а также выявлена прямопропорциональная связь величины сдвига со степенью тяжести заболевания. Эти исследования могут явиться основой для экологической оценки среды проживания организмов.

Вступление

В 50-х гг. XX ст., используя данные по относительным скоростям реакций между мечеными изотопами и молекулами, С. Сильвермен и У. Саккетт с коллегами показали, что при термическом разрыве связей C — C в различных органических веществах изотопы могут фракционироваться [1].

В настоящее время исследователи предпочитают анализировать чистые соединения углерода с известным химическим строением и изучать изотопные связи между сосуществующими в осадках органическими фазами или метаболическими родственными соединениями. Это аналогично подходу геохимика, которого всегда больше интересует элементарный или изотопный состав индивидуальных материалов, чем химический состав породы в целом.

Существует много специфических проблем и в биологии, и в геологии, при решении которых можно использовать данные по изотопам основных биогенных элементов (O, N, S, Fe, Ca, Na и др.), и особенно по изотопам углерода.

Наша задача в какой-то степени объединяет эти проблемы, т. к. заключается в изучении зависимости накопления тяжелых изотопов углерода и водорода от техногенного загрязнения окружающей среды.

Так известно, что при снижении молекулярного CO₂ из-за условий среды и биологических обстоятельств изотопное равновесие между его молекулами и ионами кислых углеродистых соединений (например, HCO₃⁻) нарушается, а из HCO₃⁻ образуется обогащенный ¹³C молекулярный CO₂, активно поступающих в дальнейшем в трофические цепи.

В 60-х гг. XX ст. в исследованиях, проведенных в лабораториях Абельсона и Дегенса было установлено, что внешняя среда обуславливает изменчивость изотопного состава некоторых элементов организма [2, 3]. Сейчас надежно установлено, что наибольшее обогащение изотопом ¹²C имеют липиды, а наименьшее – белки, аминокислоты (АК), лигнин. Фенолы в этом ряду занимают промежуточное положение. Помимо этого различается и изотопный состав углерода АК в одном и том же организме: в лейцине доля наиболее легкого изотопа углерода более высокая, чем в аспарагиновой и глутаминовой кислотах. Более того, углерод карбоксильных групп АК более богат ¹³C по сравнению с углеродом АК в целом. Эти примеры наглядно демонстрируют, насколько различным может быть изотопный состав некоторых элементов разных биохимических компонентов организмов.

Сбор, систематика и обобщение данных по изотопному составу элементов в биосистемах показывает, что развиваемые в настоящее время концепции, объясняющие закономерности внутримолекулярного распределения изотопов углерода в биогенных молекулах, очень противоречивы. Действительные причины закономерного распределения изотопов углерода в биогенных молекулах следует, по-видимому, искать как в особенностях метаболических путей, так и в суммарных изотопных эффектах.

Связь накопления ¹³C и нарушения обмена веществ

Существование живого организма как открытой, квазистационарной системы предполагает не-

прерывный приток свободной энергии из внешней среды с пищей (или светом у растений) и непрерывный приток вещества, используемого для увеличения массы при росте и размножении. Отсюда можно сделать вывод о возможности проникновения как жизненно важных, так и токсичных веществ из внешней среды в клетку.

Исследование степени проницаемости клеточных оболочек изотопными методами показало, что в действительности, практически все вещества проникают в клетку, с более значительной скоростью проникают углеводы, АК, минеральные вещества (Na^+ , Cl^- , K^+ , H_3PO_4 и др.). Сорбционный механизм может приводить как к увеличению, так и к понижению накопления данного вещества в клетке. Таким образом, изучение направленности движения веществ из внешней среды в клетку и обратно имеет очень большое значение для понимания самых существенных свойств живых клеток, определяющих функциональную активность живых организмов. Например, накопление тяжелого изотопа углерода в клетке прямо пропорционально скорости проникновения в нее АК из внешней среды, так как многие из них богаты этим стабильным изотопом. Поэтому можно предположить, что накопление ^{13}C в клетке вызывается нарушениями энергетической составляющей изотопного метаболизма, так как процессы декарбоксилирования и восстановительного аминирования (или трансаминирования) «утяжеленных» белковых АК могут сказаться на энергетическом состоянии системы. Вероятно, аналогичные явления наблюдаются и в случае биосистем, испытывающих влияние больших техногенных нагрузок.

Путем изменения структуры молекулы метаболита можно получить соединения, которые уже не могут нормально функционировать в обмене веществ и тормозят обмен соответствующих природных аналогов. В последние годы интерес к антиметаболитам значительно возрос, и были синтезированы многочисленные аналоги АК, витаминов, пуринов и др. метаболитов. Некоторые из них представляют интерес для биохимических исследований и для терапии.

Механизм действия антиметаболитов еще не совсем ясен, однако известно, что они могут тормозить обмен природных продуктов, поэтому антагонист может оказывать действие, сходное с влиянием недостаточности природного продукта обмена. В одних случаях торможение снимается одновременным или предварительным введением природного метаболита. В других случаях торможение устранить труднее или оно вообще необратимо.

При рассмотрении вопроса об аналогах АК сразу бросается в глаза, что многие природные АК сходны по своей структуре. Имеется много примеров антагонистических отношений между двумя природными АК нафтина, которые значительно усложняются в системах, содержащих много АК [4]. Можно несколько видоизменить подход к решению этой проблемы и во главу ее угла поставить не только изменения структуры молекулы метаболита, но и изменение изотопного соотношения отдельных биогенных элементов этой молекулы, например: С, Н, О или N, в случае серосодержащих АК это может быть и сера. Так, например, при изменении изотопного соотношения $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ в сторону увеличения содержания тяжелого изотопа ^{13}C , что особенно характерно для углерода моноаминодикарбоновых АК и для углерода карбоксильных групп АК относительно декарбоксилированного остатка, мы получим « утяжеленные» молекулы природных АК, что, по-видимому, может влиять на интенсивность изотопного метаболизма. Иначе говоря, АК с большим содержанием ^{13}C , по-видимому, можно рассматривать как антиметаболиты природных АК. Некоторые из искусственно синтезированных антиметаболитов представляют интерес как для биохимических исследований, так и для терапии.

Однако получить ответ о механизме действия антиметаболитов, в частности утяжеленных метаболитов природных АК, невозможно без специально поставленных исследований изолированных ферментных систем. Антагонизм между природными АК, который наиболее проявляется у группы АК с разветвленной углеродной цепью (лейцин, изолейцин и валин) – это другая сторона проблемы, которой в данном случае мы не касаемся.

Влияние изотопного соотношения водорода на состояние биосистемы

Как известно, основная масса водорода на Земле сосредоточена в гидросфере. Поскольку естественные экосистемы неразрывно связаны с гидросферой, то большинство проведенных исследований изотопного состава водорода, в том числе и дейтерия (D), в природных экосистемах опираются на эту связь. Небезразличное отношение организма к разным изотопам водорода было обнаружено при работе с тяжелой водой. Большое общетеоретическое и практическое значение исследований влияния D_2O на различные процессы в живых организмах обуславливает растущий интерес к этой проблеме. Финкель и Чайка исследовали влияние различных концентраций D_2O в

питьевої воді на розвиток трансплантованої миші опухолі. В різні строки після трансплантації вимірювали об'єм рідини, виділюваної клітками опухолі, їх об'єм і число. Було виявлено дуже різке уповільнення росту опухолі. При концентрації дейтерія в тканинних рідинках, рівній 24 %, об'єм рідини на 9-й день після введення 7×10^5 кліток цієї опухолі кожній миші був в три рази менше, ніж в контролі. Відповідно меншим було і число опухольових кліток.

Спроби теоретичного пояснення аномальних ефектів в біологічних системах не привели до позитивних результатів. Концепція, пояснювальна аномальні ефекти D і ^{18}O в D_2O і H_2^{18}O , повинна враховувати відсутність таких ефектів для ^{15}N і однаковий порядок величин ефектів для D і ^{18}O . Відповідальним за аналізовані явища могло б бути речовина, в якій порівняно відносно високий вміст водню і кисню і немає азоту. В найбільшій ступені цьому умові відповідає вода, що складає значущу частину протоплазми. Тому можна передбачити, що причиною розглянутих ізотопних ефектів є зміна ізотопного складу води. Вода в клітках знаходиться в особливому структурованому стані, проміжному між структурою рідинної води і льоду. Шари орієнтованої «кристалічної» води оточують всі гідрофільні макромолекули в протоплазмі, в тому числі молекули білка і нуклеїнових кислот. По-видимому, більш правильно говорити про відповідності яких-то властивостей не безпосередньо у рівних макромолекул, а у макромолекул, оточених шарами структурованої води. Таке співвідношення може бути суттєво порушено при нерівномірному ізотопному складі структурованої води в клітці. С цієї точки зору «ізотопний анабіоз» вказує, що відносно однорідна структура зв'язаної води будь-якого ізотопного складу забезпечує необхідне взаємодія макромолекул, без якого неможливі матричні синтези або узгоджені переміщення протоплазми при митозі.

Спостережувані явища отримали б природне пояснення, якщо б розглядані біологічні ефекти були пов'язані з певними параметрами, безпосередньо пов'язаними з молекулярною масою води. Так, наприклад, зміна молекулярної маси безпосередньо впливає на низькі колибельні частоти вузлів кристалічної решітки води і відповідні їм нульові енергії. В зв'язі з цим цікаво відзначити дуже суттєву величину відхилень визначених фонових рівнів води при зміні ізотопного складу. Ділення кліток відбувається зі складною і досконалою координацією переміщень всіх їх основних частин (хромосом, центріол, мітохондрій і т. д.). Найменше порушення нормальної послідовності цих переміщень робить процес неможливим або призводить до аномалій. Можна передбачити, що вода не тільки бере участь в гідролітичних і синтетичних процесах, що відбуваються при діленні, але і передає інформацію, необхідну для кореляції процесів в різних частинах клітки.

Накоплення важкого ізотопу вуглецю і функціональна активність організму

Таким чином, якщо ізотопний обмін, в широкому сенсі – це перерозподіл ізотопів між молекулами, який не супроводжується явними макроскопічними або фізико-хімічними процесами, то при ізотопному метаболізмі перерозподіл ізотопів (особливо накоплення більш важкого ізотопу того або іншого біогенного елемента) може змінювати інтенсивність процесу, що в свою чергу знаходить відображення в зміні функціональної (біологічної) активності організму.

В результаті ряду експериментів, в Інституті геохімії навколишнього середовища НАН і МНС України (ІГОС НАН і МНС України) виникло передбачення про те, що різний ступінь впливу техногенної навантаження на живі організми може викликати зміни на рівні ізотопного метаболізму стабільних ізотопів вуглецю [5, 6].

Для перевірки цієї гіпотези з 2000г. в ІГОС НАН і МНС України проводяться спільні роботи з Інститутом геронтології АМН України і Научним Центром радіаційної медицини АМН України. Для отримання репрезентативних даних було проведено комплекс клінічних і лабораторних досліджень вуглецю у трьох групах людей різних вікових категорій: перша група складала з здорових донорів (10 осіб), друга група – онкологічні хворі, які мають різний ступінь лейкозії (10 осіб) і третя група – хворі на ішемічну і гіпертонічну хворобу з різним ступенем тяжкості. Відбір проводився в клініках вищезгаданих медичних закладів. Для вивчення ізотопного співвідношення вуглецю використовували еритроцити, отримані з проб венозної крові. Пробу брали в стані спокою натощак.

После центрифугирования и отмывания с помощью физиологического раствора получали эритроцитарную массу, которую медленно высушивали в чашке Петри при температуре 36° С. Отношение стабильных изотопов углерода $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ определялось масс-спектрометрическим методом. Было зафиксировано, во-первых, наличие у больных лейкемией изотопного сдвига δ углерода (в среднем $-3,5\text{‰}$ в сторону увеличения содержания тяжелого изотопа) и относительная стабильность изотопного сдвига $\delta^{13}\text{C}$ в первой группе (от $-23,3\text{‰}$ до $-23,8\text{‰}$), в случае ишемической болезни от $-21,2\text{‰}$ до $-21,5\text{‰}$, а в случае гипертонии от $-21,8\text{‰}$ до $-22,5\text{‰}$. Во-вторых, было установлено, что величина изотопного сдвига углерода прямо пропорциональна степени тяжести заболевания. В то же время, проведенные исследования не выявили существенных различий в соотношении легкого и тяжелого изотопов углерода в эритроцитах здоровых молодых людей и здоровых людей пожилого возраста. Таким образом, между показателями изотопного соотношения углерода и основного обмена веществ существует корреляционная связь, что в определенной мере свидетельствует о влиянии изотопного распределения углерода в эритроцитах на интенсивность реакций внутриклеточного изотопного метаболизма.

Выводы

Дальнейшие исследования, на наш взгляд, могут определить роль изменений изотопной формулы углерода и других биогенных элементов в интенсивности ключевых реакций внутриклеточного метаболизма, в формировании различных патологий, выявить зависимость изменений изотопного соотношения от экологических факторов. В подобные эксперименты мы планируем включать и другие биогенные элементы, в частности железо. Не исключена возможность изотопных сдвигов, к примеру, в железе гема крови, структура которого целиком подобна структуре хлорофилла, но ядром последнего является железо вместо магния.

Таким образом, существует зависимость между накоплениями тяжелых изотопов биогенных молекул и изменением функциональной активности живого организма. Это положение может являться основой для экологической оценки среды обитания живых организмов, особенно в условиях увеличения техногенной нагрузки и может быть использована для создания новых методов доклинической диагностики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Органическая геохимия / Под ред. Дж. Эглинтон и М. Т. Дж. Мэрфи – Л.:»Недра», 1974. – 487с.
2. Abelson P. H., Hoering T. C. Carbon isotope fractionation in formation of amino acid by photosynthetic organisms. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1961, 47, V. 5. — P. 623 — 632.
3. Degens E. T., Quillard R. J., Sackett W. M., Hellebust J. A. Metabolic fractionation of carbon isotopes in marine plankton. – Pt. I. »Deep. Sea Res.» 1968, 15. P. 1—9.
4. Degens E. T., Behreng M., Gotthardt B., Reppmann B. Metabolic fractionation of carbon isotopes in marine plankton. – Pt. II. »Deep-Sea Res.» 1968, 15. – P. 11- 20.
5. Соботович Э. В., Лысенко О. Б. Изотопные сдвиги элементов в тканях растений как возможный индикатор биологической активности организма и фитопатологий. // Зб. наук. пр. ДНЦ РНС НАН и МЧС України, № 1, К., 2000. – С. 164 — 179.
6. Е. Соботович, О. Коркушко, О. Лысенко, В. Шатило. Індикатор біологічної активності організму? Вісн. НАН України. 2000, № 12. С. 16 — 23.