

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2003

М. И. Евгенийев¹, Е. В. Дегтерев²

ХИМИЧЕСКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ. ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ, ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РИСКА КАНЦЕРОГЕНЕЗА И ИНТОКСИКАЦИИ

¹ Казанский государственный технологический университет;

² Центр химии лекарственных средств — ВНИХФИ, Москва

Каждый из нас когда-то задается вопросом, почему воздействие химических соединений (растворителей, промышленных токсикантов и других веществ) приводит к разным последствиям для людей, находившихся в контакте с ними. Ведь на химических производствах или в лабораториях нередки случаи, когда рабочий, исследователь без видимых последствий для своего здоровья десятилетиями работает с очень токсичными веществами, в то время как их коллега испытывает тяжелые последствия токсикации организма или канцерогенеза в формально более безопасных условиях труда. Однозначный ответ на такой вопрос, очевидно, невозможен. Однако возможна оценка риска интоксикации и канцерогенеза с учетом учения о химической чувствительности и генетической детерминированности реакций биотрансформации ксенобиотиков в организме человека.

“Химическая чувствительность” или “мультиплетная химическая чувствительность” (МХЧ) в настоящее время общепризнанные термины, описывающие наиболее отличительную особенность болезни без учета ее специфической этиологии или механизма [1]. Термин МХЧ часто используют в одном из трех контекстов:

- для описания симптома;
- для описания нового медицинского явления или синдрома;
- для характеристики механизма заболевания.

Как и для любой новой теории, существуют разные точки зрения на МХЧ. Некоторые исследователи полагают, что МХЧ это психогенное явление, которое наиболее близко напоминает депрессию или посттравматический стресс; другие считают, что МХЧ может лежать в основе хронических болезней, включая бронхиальную астму, головные боли, мигрень, депрессию и синдром хронической усталости [2, 3].

Наиболее простое применение термина МХЧ связано с описанием симптомов заболеваний, связанных с компонентами запахов. Болезненная реакция на запахи характерна для 60 % рабочих, подвергающихся экспозиции растворителями [4]. Аналогичная реакция характерна и для сельскохозяйственных рабочих после острого отравления фосфорорганическими пестицидами, для работников производств химического оружия [5]. Выборочные исследования позволяют полагать, что приблизительно третья часть людей особо

чувствительна к некоторым видам запаха. Конечно, болезненность восприятия запахов не идентична МХЧ.

Химическая чувствительность появляется и развивается в две стадии. На первой стадии (индуцирование) происходит потеря толерантности после острого или хронического воздействия загрязняющих факторов окружающей среды, в т.ч. пестицидов, растворителей, лекарственных средств. На последующей стадии (запуск) наблюдается возникновение симптомов заболевания при воздействии чрезвычайно низких концентраций химических веществ, лекарственных препаратов, пищевых продуктов, автомобильных выхлопов, алкоголя.

Особенно резко МХЧ проявилась у ветеранов войны в Персидском заливе и провоцируется она прежде пищевыми продуктами или напитками [6].

МХЧ более близка к аллергии вследствие двухступенчатости процесса (индукция, запуск) и последующей “гиперчувствительности”.

Главная критика теории МХЧ сводится к тому, что она объединяет “буквально все физические или умственные заболевания” [7]. Очевидно, это замечание справедливо, но следует иметь в виду, что некоторые психические заболевания связаны с генетическим полиморфизмом, основу которого составляют химико-биологические процессы.

Практическое следствие теории МХЧ заключается в переоценке минимальных уровней риска токсикации. По оценке Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), например, каждый избыточный микрограмм бензола в воздушной среде сверх 6 мкг/м³ эквивалентен риску возникновения шести случаев заболевания лейкемии на миллион жителей. Эта величина в десятки раз меньше значений ПДК в разных странах, в том числе в РФ. Для оценки последствий воздействия канцерогенных веществ введена “Единица избыточного риска” (Unit Risk Excess), позволяющая оценивать риск поражения организма при определенном уровне воздействия на него токсичных соединений [8].

Можно выделить две наиболее важных детерминанты в риске развития заболеваний, связанных с загрязнением окружающей среды. Первой является доза токсичных веществ. В то же время очень важна генетическая детерминированность активности фермента

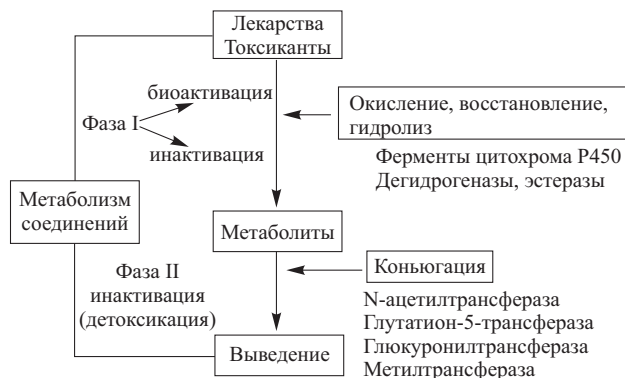


Рис. 1. Схема метаболических превращений различных ксенобиотиков в организме

тивных систем, участвующих в метаболических превращениях ксенобиотиков в организме (уникальный генетический состав).

Почему трудно выявить причины заболеваний, связанных с влиянием ксенобиотиков на организм? Влияние больших доз некоторых загрязнителей можно проследить по историям болезней, например, продолжительность и интенсивность курения. Но влияние на канцерогенез солнечных лучей, загрязненного воздуха производственных помещений значительно сложнее оценить, так как необходимо учитывать непрерывно меняющуюся интенсивность солнечной радиации или концентрации загрязнителей в воздухе в дни контакта человека с загрязнителями. Соответствующие корреляции “причина – эффект” проявляются при эпидемиологическом исследовании больших групп населения, но ее трудно выявить для каждого конкретного индивидуума.

Таблица 1
Частотность медленных ацетиляторов в различных этнических группах

Популяция	Частотность “медленного фенотипа”
Эскимосы Канады	0,05
Эскимосы Южной Аляски	0,18
Эскимосы Северной Аляски	0,27
Японцы	0,11
Айны	0,13
Корейцы	0,10
Китайцы	0,15
Индийцы	0,58
Негры США	0,51
Негры Судана	0,65
Амхара (Эфиопия)	0,83
Бушмены	0,30
Арабы Египта	0,83
Белое население США	0,58
Немцы	0,44
Скандинавы США	0,67
Итальянцы США	0,64
Финны	0,64
Саами	0,28
Норвежцы	0,52
Русские	0,52

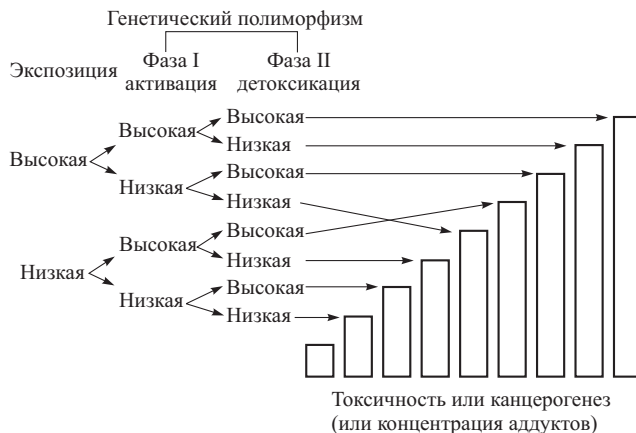


Рис. 2. Возможные комбинации влияния экспозиции токсичных соединений и генетического полиморфизма на Фазы I и II метаболических превращений на токсичность или канцерогенез

Сложность интерпретации этой зависимости связана и с генетически детерминированной предрасположенностью конкретного человека к токсичности или канцерогенезу. Экогенетика, изучающая эту зависимость, как область исследования сформировалась в середине 1970-х годов на основе достижений фармакогенетики [9 – 12].

Гены, кодирующие ферменты и ответственные за метаболизм лекарств, других химических соединений, могут влиять на интоксикацию и канцерогенез при совокупном действии химических, физических и биологических факторов. Различия в активности генов (генотип), в степени сопротивляемости организма или чувствительности его к токсичным или канцерогенным веществам могут приводить к заболеваниям одних индивидуумов, в то время как другие люди в тех же условиях не испытывают подобных эффектов. Химические загрязнители, различные физические воздействия, а также эффекты воздействия других генов (биологическое воздействие) способны влиять на генотип, формируя фенотип. Фенотип может измениться и в результате интенсивной мышечной деятельности профессиональных спортсменов [13].

Гены восприимчивости. Под “геном восприимчивости” подразумевается любой ген, с которым могут взаимодействовать компоненты окружающей среды в процессах детоксикации. Около 30000 – 40000 генов, имеющих в геноме человека, можно условно разделить на три группы: 1 — гены метаболизма; 2 — гены переноса сигнала (трансдукции); и 3 — гены инфраструктуры. Загрязняющие факторы окружающей среды могут влиять на гены всех типов, приводя к интоксикации и канцерогенезу [14].

Метаболизм лекарственных и других веществ в организме происходит в результате реакций функционализации — реакции фазы I и конъюгации — реакции фазы II (рис. 1). Вначале эти две последовательные реакции расценивались как система детоксикации печени, однако некоторые из этих функций затем были обнаружены в легких, почках и желудочно-кишечном тракте.

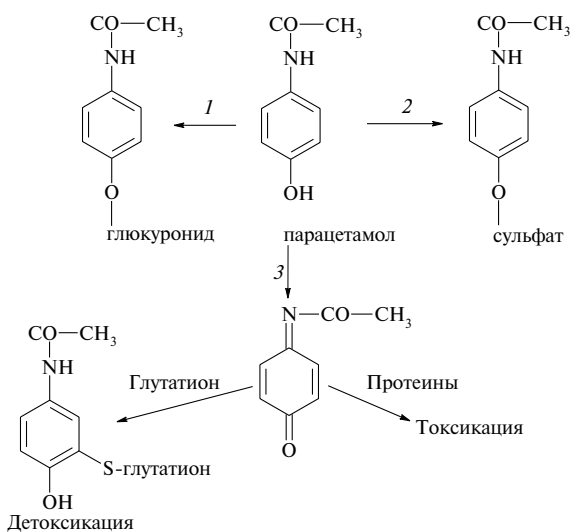


Рис. 3. Схема основных метаболических превращений парацетамола в организме. 1 — образование глюкуронида при действии фермента уридиндифосфоглюкурозилтрансферазы; 2 — сульфирование при действии фенолсульфотрансферазы; 3 — окисление до N-ацетилбензохинонимина при действии ферментов CYP2E1, 3A4, 1A2, простагландинсинтазы и циклооксигеназы

Инертные для человека химические вещества, например бензопирен, могут метаболически активироваться в организме до канцерогенных и токсичных гидроксипроизводных [15]. В фазе I ферментативных превращений, многие из которых осуществляет цитохром P450, в эндогенный или экзогенный субстрат вводится функциональная (обычно гидроксильная) группа. Так, один из ферментов цитохрома P450 (CYP2E1), биоактивирует ароматические углеводороды (бензол и др.), галогенуглеводороды (хлороформ, метилхлорид и др.), N-нитрозоамины и спирты. Этим провоцируется канцерогенез и интоксикация организма [16]. В фазе I метаболических превращений также могут образовываться эпоксидные и гидроксильные группы. Они представляют собой реакционноспособные промежуточные соединения, способные к ковалентным взаимодействиям с нуклеиновыми кислотами и белками. В фазе II метаболических превращений, в которых участвуют трансферазы (глутатионтрансфераза, N-ацетилтрансфераза и др.), эти окисленные промежуточные соединения выступают в качестве субстратов, в которые за счет ферментативного катализа вводятся различные функциональные группы (сульфат, глутатион, остаток глюкуроновой кислоты, цистеин или ацетильная группа). Таким образом протекает конъюгация метаболизируемых веществ. В результате ряда ферментативных реакций образуются гидрофильные продукты, которые могут легко выводиться из организма.

Реакции фазы II могут приводить и к метаболической активации (повышению токсичности) веществ. Это происходит, например, при образовании метилпроизводных ртути в результате реакций с участием метилтрансферазы. Многие реакции фаз I и II метаболических превращений достаточно хорошо изучены,

но пока нет клинических примеров того, что дефицит экогенетических ферментов может компенсироваться другими ферментами [14].

Метаболические превращения в организме могут приводить к большему риску интоксикации и канцерогенеза при равной экспозиции токсикантов у индивидуумов с высокой активностью ферментов фазы I и низкой активностью ферментов фазы II по сравнению с людьми с пониженной активностью ферментов фазы I и высокой активностью ферментов фазы II (рис. 2). Так, повышенный риск развития рака бронхов, спровоцированный курением, связан со специфическими аллелями генов CYP1A1 и GSTM1 [17]. Низкая активность сульфотрансферазы приводит к увеличению частоты различных дегенеративных неврологических и иммунологических заболеваний, потере толерантности к лекарственным препаратам и химическим веществам. Болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, ревматоидный артрит, повышенная чувствительность к компонентам пищевых продуктов и фенольным соединениям также является следствием пониженной активности этой ферментной системы [18].

В качестве примера на рис. 3 приведена схема возможных метаболических превращений парацетамола. В зависимости от генетически детерминированной активности ферментов разных фаз при метаболизме этого вещества возможны процессы как детоксикации, так и интоксикации организма.

Полиморфизм вкусовых ощущений фенилтио мочевины стал первым примером клинически изученного (1932 г.) различия индивидуального ответа организма на воздействие химического соединения [19].

Полиморфизм N-ацелирования идентифицирован в конце 40-х годов на пациентах, применяющих изониазид. Индивидуумы были фенотипированы как “медленные” и “быстрые” ацетиляторы. Частотность медленного типа ацелирования меняется от 10 % (у японцев) до 83 % для жителей некоторых средиземноморских стран (табл. 1) [19].

За фенотип быстрого и медленного ацелирования преимущественно ответственен ген NAT2, кодирующий фермент NAT2, который имеет в 10 раз меньшее значение константы Михаэлиса-Ментен K_m для метаболизма ароматических аминов, чем NAT1. Фенотипу медленного ацелирования соответствует более высокий риск (соотношение 16,7/1) заболеваний рака мочевыводящих путей для работников производств красителей [20]. Это связано с тем, что низкая скорость N-ацелирования приводит к уменьшению скорости детоксикации ариламиновых красителей в печени и увеличению концентрации реакционноспособных промежуточных продуктов в организме. Это способствует повышению риска развития рака [21].

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (ГФД) имеет наибольшее количество вариаций в организме человека. Приблизительно 10 % населения мира имеют более 340 различных вариантов этого белка. ГФД — фермент в гексозомонофосфатном шунте, один из основных источников НАДФ и восстановления уровня глу-

татиона в эритроцитах. Различия в активности ГФД определяет бимодальное распределение гемолитической анемии, на которое могут влиять сульфаниламидные препараты. Этнические различия полиморфизма ГФД весьма существенны. Например, у евреев сефардов и ашкенази активность этого фермента может различаться более чем в 100 раз [22]. На людей с дефицитом ГФД и медленным фенотипом ацетилирования весьма драматично воздействуют ароматические амины. В табл. 2 показано влияние фенотипа ацетилирования и дефицита ГФД на относительное содержание аддукта анилина с гемоглобином крови работников химических производств, подвергавшихся экспозиции анилином [23]. Как видно, при разных вариациях генетического полиморфизма наибольшее содержание аддукта-токсиканта наблюдается при медленном типе ацетилирования и дефиците ГФД. При дефиците последнего (вероятно, из-за уменьшения сопряжения глутатиона глутатион-S-трансферазой в фазу II процесса детоксикации) и низкой скорости N-ацетилирования (из-за уменьшения детоксикации реакционноспособных промежуточных N-гидроксипроизводных анилина) образуется большее количество реакционноспособных промежуточных продуктов метаболизма анилина, ковалентно связанных с гемоглобином.

Примером влияния фармакогенетического различия на здоровье человека может служить полиморфизм фермента тиопуринометилтрансфераза (ТПМТ). Он принимает участие в детоксикации 6-меркаптопурина (6-МП), используемого при химиотерапии острой лейкемии. В прошлом, когда пациентам прописывали одинаковую дозировку 6-МП, приблизительно у 87 % из них лейкемия развивалась повторно из-за недостаточной дозировки лекарства, только 13 % больных имели высокую вероятность излечения заболевания, а каждый трехсотый пациент умирал в результате передозировки препарата. Для предотвращения таких последствий пациенты должны фенотипироваться на активность ТПМТ до химиотерапии 6-МП. Пациентам с фенотипом высокой активности фермента прописывают 4-х кратную дозу 6-МП при фенотипе с низкой активностью — требуется в 10–15 раз более низкая доза 6-МП [24].

Другим примером является полиморфизм фермента дебризохингидроксилазы, участвующего в метаболиз-

ме антигипотензивного препарата дебризохин. В конце 70-х годов были обнаружены пациенты с плохим метаболизмом (до 6–10 % для кавказской популяции), по сравнению с которыми у людей с высокой активностью этого фермента метаболизм препарата протекает в 10–40 раз быстрее. Как и в случае с другими фармакогенетическими полиморфизмами существуют этнические различия в фенотипе дебризохингидроксилазы. Например, фенотип с низкой активностью практически отсутствует в Японии и Лапландии. “Дебризохиновая” группа включает более 70 лекарственных препаратов, включая антиаритмические, антигипотензивные и психотропные препараты, β-блокаторы, ингибиторы моноаминоксидазы, производные морфина, трициклические антидепрессанты. Фенотип высокой активности дебризохингидроксилазы связан с повышенным риском канцерогенеза и интоксикации. Причина этого неизвестна, но может отражать метаболическую активацию одного или нескольких канцерогенных промежуточных продуктов [10].

Фермент параоксоназа (Ca²⁺-зависимая эстераза), также характеризующийся полиморфизмом, осуществляет детоксикацию фосфорорганических веществ (например, параоксона — биологически активного метаболита фосфорорганического пестицида паратиона). Синдром ветеранов войн частично объясняют полиморфизмом параоксидазы [25, 26].

Полиморфизм митохондриальной альдегиддегидрогеназы (АДГ) имеет важное клиническое значение [27]. При употреблении алкоголя происходит превращение этанола в ацетальдегид, являющийся токсичным метаболитом. Если процесс детоксикации альдегида под влиянием АДГ недостаточно быстр, потребление алкоголя приводит к нарастанию концентрации альдегида в крови и интоксикации. Наблюдаются этнические различия в полиморфизме фермента (табл. 3) [28]. АДГ является тетрамером. Если в ней содержится хотя бы один неактивный фрагмент, весь тетрамер становится неэффективным как энзим.

Полиморфизм рецептора гена ANR был идентифицирован при изучении индуцированного метаболизма бензопирена у мышей, протекающего при катализе арилуглеводородгидроксилазой (АУГ). Этот фермент присутствует во многих человеческих органах и тканях (в плаценте, легком, сердце, поджелудочной железе, почке, миндалинах, лимфоцитах и различных клетках). В человеческой популяции фенотип высокоспе-

Таблица 2
Влияние фенотипа ацетилирования и дефицита глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы на относительное содержание аддукта анилина с гемоглобином в крови работников химических производств, подвергавшихся экспозиции анилином

Фенотип ацетилирования		Дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы		Относительное содержание аддукта анилина с гемоглобином в крови, %
Быстрый	Медленный	Нет	Есть	
+		+		2
+			+	30
	+	+		20
	+		+	100

Таблица 3
Распределение дефицита альдегиддегидрогеназы в различных этнических группах

Популяция	Процент дефицита фермента
Японцы	44
Южноамериканские индейцы	40–45
Североамериканские индейцы	2–5
Жители центральной и юго-восточной Азии	30–50
Европейцы, жители Ближнего Востока и Африки	0

цифичной АУГ коррелирует с фенотипом высокой индуцируемости CYP1A1. Это приводит к различиям в индивидуальной восприимчивости к канцеро- и мутагенезу, тератогенным эффектам, интоксикации в отношении печени, глаз, костного мозга и нарушениям иммунной системы [29]. Обнаружены клинические корреляции между генетическими различиями в гене человека АНР и некоторыми видами токсичности и формами рака [30 – 32].

Величина K_m для высокоспецифичной АУГ по крайней мере в 10 – 12 раз больше, чем для низкоспецифичного фермента [33]. Для людей, имеющих фенотип высокоспецифичной АУГ, одна и та же доза сигаретного дыма может привести к 10 – 12 раз большему количеству индуцированной CYP1A1 (и, таким образом, к большему риску возникновения рака легкого) по сравнению с индивидуумами с низкоспецифичной АУГ. Для курильщиков с фенотипом высокой индуцируемости (АНР^H) риск развития рака бронхов, гортани и горла (но не рака почек, мочеочника или мочевого пузыря) возрастает в 3 – 20 раз по сравнению с курильщиками с фенотипом низкой индуцируемости (АНР^L) [32].

Ген CYP1A2 кодирует фермент ариламиנגидроксилазу, метаболизирующий проканцерогены (ароматические амины, включая компоненты табачного дыма — нитрозоамины типа 4-(метилнитрозоамино)-1-3-пиридил-1-бутанона и др.). Индивидуальные различия в экспрессии гена CYP1A2 также играют роль в интоксикации и канцерогенезе [32].

Многочисленные исследования демонстрируют важную роль полиморфизма фенотипа как фактора риска в развитии канцерогенеза и других заболеваний, связанных с воздействием химических веществ при их метаболических превращениях в организме. Выявление генетических основ этих полиморфизмов, изучение зависимостей между генетическим полиморфизмом, восприимчивостью к канцерогенезу и токсичности, с одной стороны, и воздействием загрязняющих факторов окружающей среды, с другой, — это новая многообещающая область науки. Чрезвычайно важна роль неинвазивных аналитических методов, которые могут применяться для изучения фенотипических особенностей человеческой популяции в клинических условиях [33 – 36].

Идентификация генетических факторов имеет важное значение для ранней диагностики и предотвращения заболеваний человека. С точки зрения экономических и гуманитарных соображений, одной из приоритетных задач здравоохранения будущего должно стать выявление химически чувствительных групп населения, наиболее уязвимых к воздействию токсичных соединений, и создание стратегии их защиты от воздействия ксенобиотиков на работе и в домашних условиях [37].

ЛИТЕРАТУРА

1. R. E. Gots, T. D. Hamosh, W. G. Flamm, C. J. Carr, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **18**, 61 – 78 (1993).

2. N. A. Ashford and C. S. Miller, *Chemical Sensitivity*, A Report to the New Jersey State Department of Health (1989).
3. N. A. Ashford and C. S. Miller, *Chemical Exposures: Low Levels and High Stakes*, Van Nostrand Reinhold, New York (1991).
4. C. M. Ryan and I. A. Morrow, M. J. Hodgson, *Am. J. Psychiatry*, **145**, 1442 – 1445 (1988).
5. I. R. Tabershaw and C. Cooper, *J. Occup. Med.*, **8**, 5 – 20 (1966).
6. C. S. Miller, *Toxicology*, **111**, 69 – 86 (1996).
7. W. J. Waddell, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **18**, 13 – 22 (1993).
8. World Health Organisation, *Updating and revision of the air quality guidelines for Europe*, WHO Meeting Report 11 – 13 January 1993.
9. И. Соради, *Основы и педиатрические аспекты фармакогенетики*, изд-во АН Венгрии, Будапешт (1984).
10. F. J. Gonzalez and J. R. Idle, *Clin. Pharmacokin.*, **26**, 59 – 70 (1994).
11. D. W. Nebert and M. J. Carvan, *Toxicol. Industr. Health.*, **13**, 163 – 192 (1997).
12. D. W. Nebert, *Clin. Genet.*, **56**, 247 – 258 (1999).
13. P. A. Абзалов, P. P. Нигматуллина, Т. Н. Хайруллина и др., *Бюл. экстрим. биол. и мед.*, **130**(12), 620 – 622 (2000).
14. D. W. Nebert and A. L. Roe, *Sci. Total Environ.*, **274**, 93 – 102 (2001).
15. O. Pelkonen and D. W. Nebert, *Pharmacol. Rev.*, **34**, 189 – 222 (1982).
16. J. L. Raucy, *Toxicology*, **105**, 217 – 223 (1995).
17. S. Hayashi, J. Watanabe, K. Kawajiri, *Jpn. J. Cancer Res.*, **83**, 866 – 870 (1992).
18. S. A. McFadden, *Toxicology*, **111**, 43 – 65 (1996).
19. D. W. Nebert and W. W. Weber, Pharmacogenetics, in: W. B. Pratt, P. W. Taylor, (eds.) *Principles of drug action. The basis of pharmacology*, 3rd edition, Churchill Livingstone Inc., New York (1990).
20. W. W. Weber, *Pharmacogenetics*, Oxford University Press, New York-Oxford (1997).
21. F. F. Kadlubar, *Drug Metab. Dispos.*, **26**, 37 – 46 (1994).
22. W. Kalow and L. Bertilsson, *Adv. Drug Res.*, **25**, 1 – 53 (1994).
23. J. Lewalter and U. Korallus, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **56**, 179 – 196 (1985).
24. R. M. Weinshilboun, D. M. Otterness, C. L. Szumlanski, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 19 – 52 (1999).
25. R. W. Haley, S. Billecke, B. N. La Du, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **57**, 227 – 233 (1999).
26. V. H. Brophy, G. P. Jarvik, R. J. Richter, et al., *Pharmacogenetics*, **10**, 453 – 460 (2000).
27. V. Vasiliou, *Aldehyde dehydrogenase gene superfamily web site*, (2000); www.uc.hsc.edu/sp/sp/alcdbase/aldhcv.html/
28. H. W. Goedde, D. P. Agarwal, in: *Ethnic differences in reactions to drugs and xenobiotics*, Kalow W., Goedde H. W., Agarwal D. P. (eds.), Alan R. Liss, New York (1986).
29. D. W. Nebert, *Crit. Rev. Toxicol.*, **20**, 153 – 174 (1989).
30. N. Caporaso, M. T. Landi, P. Vineis, *Pharmacogenetics*, **1**, 4 – 19 (1991).
31. D. W. Nebert, A. Puga, V. Vasiliou, *Ann. NY Acad. Sci.*, **685**, 624 – 640 (1993).
32. D. W. Nebert, R. A. McKinnon, A. Puga, *DNA Cell Biol.*, **15**, 273 – 280 (1996).
33. Л. Е. Холодов, В. П. Яковлев, *Клиническая фармакокинетика*, Медицина, Москва (1985).
34. М. И. Евгеньев, С. Ю. Гармонов, В. И. Погорельцев и др., *Клин. лабор. диагностика*, № 5, 24 – 27 (1996).
35. М. И. Evgen'ev, S. Yu. Garmonov, I. I. Evgen'eva, et al., *Talanta*, **47**(10), 891 – 898 (1998).
36. М. И. Евгеньев, С. Ю. Гармонов, Л. Ш. Шакирова, В. И. Погорельцев, *Хим.-фарм. журн.*, **34**(11), 5 – 8 (2000).
37. D. R. Pfof, M. T. Boyce-Jacino, D. M. Grant, *Trends in Biotechnol.*, **18**, 334 – 338 (2000).

Поступила 12.11.02