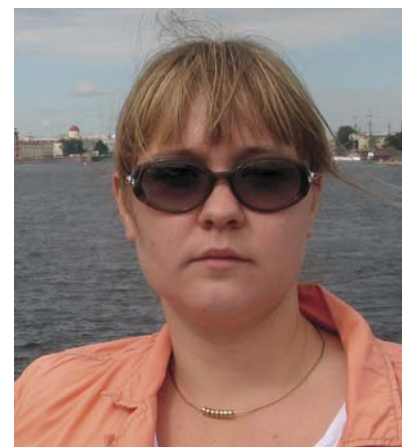


ЧЕЛОВЕК

В.С. СИДОРЕНКО, А. ГРОЛЛМАН, Д.О. ЖАРКОВ

# Токсикологический детектив или Дело балканской эндемичной **НЕФРОПАТИИ**



СИДОРЕНКО Виктория Сергеевна – кандидат биологических наук, инструктор лаборатории химической биологии департамента фармакологических наук Университета штата Нью-Йорк (Стони-Брук, США). Автор и соавтор 12 научных работ



ГРОЛЛМАН Артур – доктор медицины, профессор, заведующий лабораторией химической биологии департамента фармакологических наук Университета штата Нью-Йорк (Стони-Брук, США). За исследования балканской эндемичной нефропатии удостоен звания почетного гражданина Хорватии. Автор и соавтор более 200 научных работ



ЖАРКОВ Дмитрий Олегович – доктор биологических наук, заведующий группой взаимодействия биополимеров Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). В течение 8 лет работал в лаборатории А.Гроллмана (США). Автор и соавтор 80 научных работ

*Как, вам еще не страшно жить в этом мире? В мире, где каждый вдох, каждый съеденный кусочек может оказаться смертельно опасным? Ведь в нашем окружении имеется огромное количество явно бесполезных вещей, которые в сочетании с генетической предрасположенностью могут приводить к самым печальным последствиям для здоровья. Убедительным свидетельством этому служит острозаметная и запутанная история многолетних поисков растительного токсина-убийцы, вызывавшего тяжелейшее поражение почек у сербских крестьян и светских бельгийских дам, рассказанная ее непосредственными участниками*

**Ключевые слова:** растительные токсины, балканская эндемичная нефропатия, мутагенез, канцерогенез, репарация ДНК.  
**Key words:** plant toxins, Balkan endemic nephropathy, mutagenesis, carcinogenesis, DNA repair

© В.С. Сидоренко, А. Гроллман, Д.О. Жарков, 2014

И вот начала Умная Эльза плакать и причитать: «Коли выйду я замуж за Ганса, и родится у нас ребенок, и вырастет он, и пошлем мы его в погреб пива нацедить, вдруг упадет ему на голову кирка и убьет его насмерть».  
Братья Гримм. Умная Эльза.

Знаете ли вы, что даже в одной чашке кофе содержится около тысячи разнообразных химических веществ, половина из которых канцерогенны? Это открытие сделал американский биохимик Б. Эймс, изобретатель всемирно известного теста на мутагенность химикатов: согласно его исследованиям, в чашке кофе действительно содержится около пятисот разных канцерогенов, но опасность они представляют только в дозах, на много порядков превышающих «кофейную».

Еще один пример – афлатоксины, продукты жизнедеятельности грибов рода *Aspergillus*, которые поражают многие пищевые продукты: арахис, кукурузу, рис, оливки, молоко... Токсины эти многократно повышают риск возникновения рака печени, а если у человека к тому же имеется гепатит В и вариации в некоторых генах, отвечающих за метаболическую активацию ксенобиотиков (веществ, поступающих в организм с пищей), то рак ему практически гарантирован.

В Китае, например, есть сельские районы, где заболеваемость раком печени бьет все мировые рекорды. Почему? Во-первых, там едят много арахиса, который хранят в условиях высокой влажности, идеальных для роста грибка; во-вторых, поскольку гигиена и санитария оставляют желать лучшего, здесь буйствует гепатит; в-третьих, среди местного населения широко распространены гены, способствующие более эффективному превращению афлатоксинов в мутагенные производные.

Нам с вами нет особого смысла бояться афлатоксинов – если не жевать заплесневелый арахис. Однако нужно четко понимать, что риск развития многих заболеваний, в особенности онкологических, зависит от взаимодействия факторов окружающей среды и наследственности. Выявление таких факторов и предотвращение воздействия на организм потенциальных канцерогенов нередко представляет собой нетривиальную задачу.

Действия исследователей в этом случае напоминают классические детективные истории, в которых тщательно и скрупулезно собирается информация, на основе известных данных определяется круг подозреваемых, проводятся следственные эксперименты в виде лабораторных исследований и в итоге выявляется фактор риска. Зачастую идентифицировать канцероген или токсин и доказать его причастность удается далеко не сразу...

## Эпизод 1. На прекрасном голубом Дунае

Блажен, кто славный берег Дуная  
Своею смертью освятит:  
К нему навстречу дева рая  
С улыбкой страстной полетит  
А. С. Пушкин. Бахчисарайский фонтан.

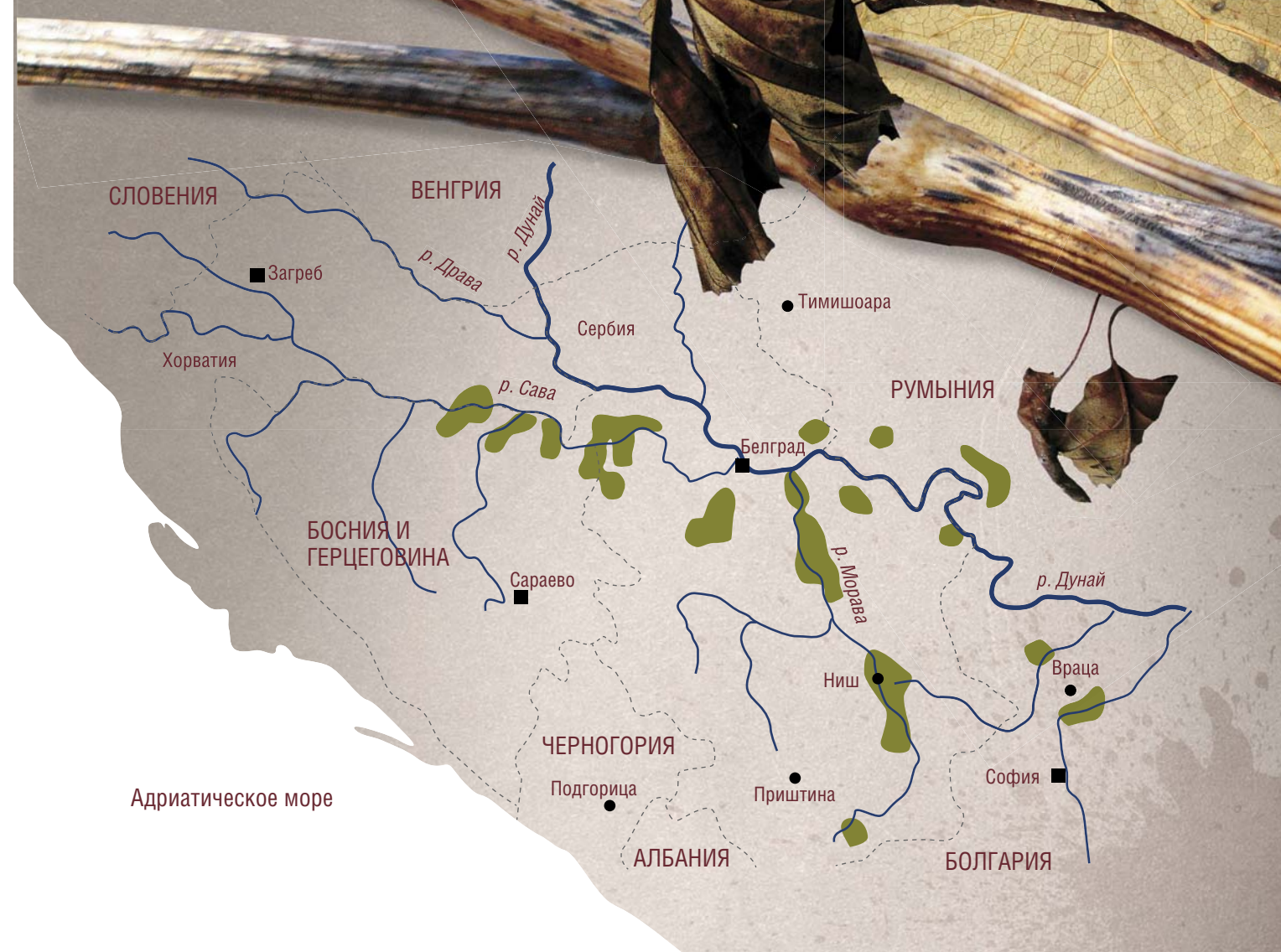
В 1956 г. провинциальный болгарский врач Й. Танчев опубликовал в малоизвестном журнале «Современная медицина» первое сообщение о странном виде хронического нефрита, обнаруженного у жителей городка Враца и его окрестностей. От обычного нефрита он отличался кардинально: поражал только взрослых, прогрессировал медленно, не сопровождался гипертензией и повышенным белком в моче. Главное отличие же состояло в том, что у больных желтели ладони и подошвы – этот диагностический признак потом получил название «симптома Танчева».

При болезни поражались проксимальные каналцы почек, что неотвратимо вызывает сначала фиброз почечной ткани, а затем почечную недостаточность. При этом практически в половине случаев развивался рак верхних отделов мочеполового тракта, что достаточно необычно, поскольку большинство онкологических заболеваний мочеполового тракта приходится на его нижние участки – мочевого пузыря и уретру.

Потом оказалось, что подобных пациентов наблюдали в Югославии, Болгарии и Румынии, начиная еще с 1920-х гг., причем исключительно в маленьких городах и селах, стоящих на Дунае или на его притоках. Из-за узости ареала болезнь получила название «балканская (дунайская) эндемичная нефропатия».

С самого начала эпидемиологи были поражены странной избирательностью этой болезни. Она могла возникать только в одной из двух соседних деревень, а внутри деревни захватывать по несколько дворов, расположенных или рядом, или в разных концах поселения, но не трогать остальные. Все это не согласовывалось с гипотезой, что причиной болезни могли быть какие-то факторы окружающей среды. А поскольку болезнь могла поражать нескольких членов одной семьи только в одном поколении, а в других случаях затрагивать несколько поколений, то ее было трудно объяснить и наследственными причинами.

В середине XX в. число заболевших балканской эндемичной нефропатией по различным подсчетам составляло 0,5–4% от общего числа жителей затронутых областей, что соответствовало очень высокому уровню заболеваемости. При этом в течение примерно года после постановки диагноза больной умирал. Однако к концу века болезнь пошла на спад, хотя и в наши дни в районе р. Колубара (Сербия) все еще регистрируют



новые случаи. Сменился и возрастной рубеж: если в конце 1950-х гг. средний возраст заболевших составлял 45 лет, то сейчас – 69 лет.

Балканская эндемичная нефропатия стала настоящим вызовом ученым. В число первых подозреваемых попали генетические факторы: может быть, среди местных жителей часто встречается какая-то мутация, которая служит причиной болезни? И действительно, в третьей хромосоме был обнаружен участок, который может служить маркером предрасположенности к нефропатии.

Но все оказалось не так просто. С гипотезой о патологической мутации хорошо согласовался тот факт, что у некоторых жителей, покинувших эндемичные районы, развитие балканской нефропатии наблюдали спустя многие годы после переезда. Однако болезнь поражала и иммигрантов, приехавших на берега Дуная издали, а это уже свидетельствовало не в пользу генетических факторов. Стало ясно, что хотя генетическая предрасположенность играет важную роль в развитии балканской нефропатии, она не служит ее непосредственной причиной.

Область распространения балканской эндемичной нефропатии очень узка, хотя затрагивает сразу несколько стран: Сербию, Югославию, Болгарию и Румынию. Болезнь преимущественно наблюдалась у населения маленьких городов и сел, стоящих на Дунае и его притоках. Рис. В. Сидоренко

Одновременно с генетическими исследованиями был развернут поиск токсина, который мог приводить к нефропатии. Анализ воды не выявил наличия солей тяжелых металлов в недопустимых для здоровья количествах. В местную воду могли также попадать полициклические ароматические углеводороды (известные нефротоксины и канцерогены), вымываемые из угольных копей, расположенных вблизи эндемичных поселений, однако эти подозрения не подтвердились. Также из-за недостаточности «улик» были отвергнуты версии о возможной причастности вирусных и бактериальных инфекций и дефицита микроэлементов.

# 广防己

Кирказон гуан-фанцзи  
(*Aristolochia fangchi*)

# 粉防己

Стефания четырехтычинковая  
(*Stephania tetrandra*)

В китайском языке иероглифы, обозначающие названия двух разных растений, – стефании четырехтычинковой и кирказона гуан-фанцзи, пишутся практически одинаково. Однако в отличие от безобидной стефании кирказон является настоящим растением-убийцей

Зато под пристальное внимание исследователей попал *охратоксин А* – продукт метаболизма некоторых грибов, часто заражающих молочные продукты, крупы и хлебобулочные изделия. Было известно, что этот токсин приводит к нефропатии и развитию злокачественных опухолей у свиней. Экспериментальные исследования на лабораторных животных показали, что токсин образует ковалентные комплексы («аддукты») с основаниями ДНК, что и приводит к возникновению мутаций.

## Эпизод 2. Смерть в фитнес-клубе

*А гренка в нашем ресторане называется крутон. Это точно такой же кусочек поджаренного хлеба, но гренка не может стоить восемь долларов, а крутон – может. А дальше ты начинаешь искать хоть какой-то вкус, отличающий этот крутон от гренки. И находишь! Х/ф «О чем говорят мужчины»*

Предположение о том, что охратоксин А вызывает балканскую нефропатию, оказалось очень привлекательным, так как очаги заражения им пищевых про-

дуктов были обнаружены в некоторых эндемичных районах Болгарии и Хорватии. Более того, у некоторых болгарских пациентов в опухолевых тканях почек были обнаружены и сами аддукты охратоксина А с ДНК.

Казалось бы, виновник обнаружен и инспектор Лестрейд мог уже выписывать ордер на арест... если бы не другой детективный случай, произошедший в 1991 г. в Бельгии. Около ста женщин из «высшего общества», посещавших некий гламурный гибридный фитнес-клуба и клиники-санатория, были госпитализированы с дисфункцией почек после принятия распространявшихся там китайских травяных сборов для снижения веса. Болезнь была настолько необычна, что получила особое название – «китайская травяная нефропатия». Сопровождалась она фиброзом почечных канальцев, медленно переходящим в дисфункцию почек. Всем пострадавшим в итоге пересадили почки, а к настоящему времени у половины пациенток развился рак верхних отделов мочеполового тракта... Внимательный читатель, безусловно, уже уловил связь между балканской деревней и бельгийским гламуром.

Как выяснилось в ходе расследования, в котором помимо ученых принимала участие и полиция, китайские травяные сборы для похудения вместо травяного экстракта из стефании четырехтычинковой (*Stephania tetrandra*) содержали экстракт совсем другого растения – кирказона гуан-фанцзи (*Aristolochia fangchi*). Поразительно, но роковая ошибка произошла из-за схожести иероглифического написания китайских названий растений.

Подтверждением наличия кирказона в снабдках для снижения веса послужил фитохимический анализ, показавший присутствие продуктов метаболизма растения – аристолаховых кислот и их производных, аристолактамов. Дальнейшее исследование тканей почек пострадавших показало наличие в их ДНК аддуктов аристолаховой кислоты. А вот аддуктов с охратоксином выявлено не было ни у больных, ни у крыс при введении им вытяжки из «подозреваемых» таблеток.

Так как в более ранних исследованиях аристолаховых кислот был показан их нефротоксический и канцерогенный потенциал, китайскую травяную нефропатию переименовали в «аристолаховую нефропатию», и токсикологи решили поподробнее изучить нового подозреваемого. Ведь до сих пор по всему миру регистрируются все новые и новые случаи возникновения нефропатии от китайских трав – и только ли кирказон здесь виноват?

Кирказон обыкновенный, или ломоносвидный (*Aristolochia clematitis*). Распространен в Европе, европейской части России, Закавказье и Северном Кавказе. Фото А. Королюка





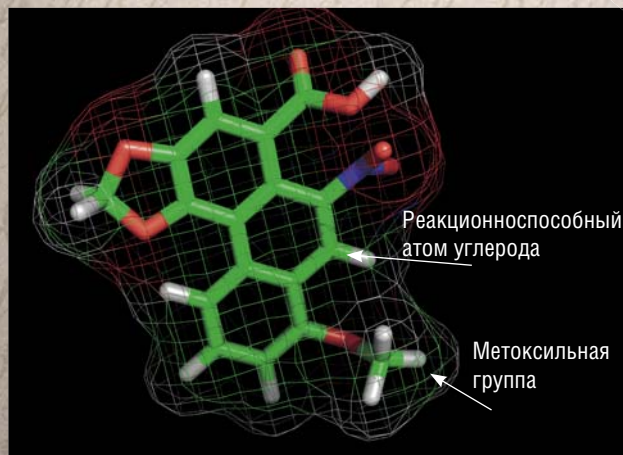
Созревающий плод кирказона ломоносovidного. Чувашия, окр. г. Шумерля, Кумашкинский заказник, Соколова поляна. Фото С. Аполлонова

## Характеристика подозреваемого: долгая карьера в медицине

Для защиты полых органов дать состав «Три цхиг-тхуба» из мозга зайца, медвежьей желчи и кунжута. Чтобы сбить огонь желчи, чередовать «Три цхиг-тхуба» с составом из шафрана, бамбуковой манны, меконопсиса цельнолистного, сверци, кирказона и мумие, к которым в зависимости от силы жара «проводником» соответственно назначить или камфору, или сандал белый, или безоар. «Чжуд-ши»

А Джозеф! Подумать только, Джозеф оказался негодяем и вором! А. Конан Дойл. «Морской договор»

Кирказон оказался в китайских смесях неспроста. Первые упоминания об этом растении и его целебных свойствах встречаются еще в трудах Гиппократов. Разные виды кирказона (всего их известно более сотни) использовали в народной медицине по всему миру. Кирказон обыкновенный или ломоносovidный (*Aristolochia clematitis*) растет в Европе, индийский (*A. indica*) – в Южной Азии, змеевидный (*A. serpentaria*) – в Северной Америке, прицветниковый (*A. bracteolata*) – в Африке. И «змеиный корень» американских индейцев, и «тысяча человек» аргентинских пастухов-гаучо – это все тот же кирказон.



В кирказоне содержится два токсина – аристороховая кислота I (вверху) и аристороховая кислота II, у которой вместо метоксильной группы –  $\text{OCH}_3$  расположен атом водорода. Через реакционноспособный атом углерода аристороховые кислоты присоединяются к аминогруппам оснований ДНК. Зеленым цветом окрашены атомы С, белым – Н, красным – О, синим – N

Список болезней, для лечения которых это растение применяется в народной медицине, просто поражает. Кажется, русская народная медицина – единственная в мире, где он не используется, да и то потому, видимо, что произрастает он только в южных районах нашей страны. Показаний к использованию кирказона множество: диарея, боли в животе, укусы змей и скорпионов, отравления, контрацепция, заболевания, передающиеся половым путем, заболевания центральной нервной и сердечнососудистой систем, грибковые инфекции, малярия, глисты, экземы, абсцессы...

При этом доказательной базы во всех этих случаях не было практически никакой. Достаточно сказать, что в Европе с самых древних времен кирказон обыкновенный использовали при родовспоможении (по-английски он так и называется – birthwort, «родовая трава»), основываясь на отдаленном внешнем сходстве его цветков с маткой!

Все части этого растения и всего его виды содержат аристороховые кислоты и их производные в том или ином количестве. После того, как в 1982 г. на лабораторных крысах был показан нефротоксический и канцерогенный эффект смеси аристороховых кислот, попытки выделить из растения какие-либо полезные вещества постепенно прекратились. В Европе запретили применение травяных сборов, содержащих кирказоны, и экстрактов из них, однако китайская медицина продолжала держаться своих традиций.

## Осмотр места преступления

Неустановленные преступники взломали дверь склада и похитили все меховые предметы за исключением кофта, который, видимо, еще не дорос до шапки. Из милицейского протокола

После открытия нефропатических и канцерогенных свойств кирказона возник закономерный вопрос: если балканская нефропатия и китайская травяная нефропатия вызваны одним и тем же агентом, каким же образом балканское население подверглось воздействию аристороховых кислот? Ведь жители придунайских деревень, понятное дело, не употребляли средств традиционной китайской медицины. Чтобы ответить на этот вопрос, на берега Дуная отправилась группа ученых-токсикологов из США и Хорватии под руководством А. Гроллмана и Б. Елаковича.

Оказалось, что как и в большинстве небогатых земледельческих районов, основу диеты жителей областей, эндемичных по балканской нефропатии, в прежние времена составлял хлеб. До недавнего времени крестьяне сами собирали пшеницу и мололи зерно на небольших местных мельницах. Осмотрев посевы и опросив местных жителей, исследователи подтвердили, что обычный

для этих мест кирказон растет на полях как сорняк, и его семена попадают на мельницу вместе с зернами злаков.

Более того: по размеру и по весу семена кирказона мало отличаются от пшеничных и не отделяются от них ни при обмолоте, ни на других этапах подготовки зерна к помолу. Съедая каравай хлеба в день, средний житель деревни подвергался постоянному воздействию аристороховых кислот в немалых дозах. Когда в конце XX в. потребление местных продуктов снизилось, стала реже проявляться и болезнь.

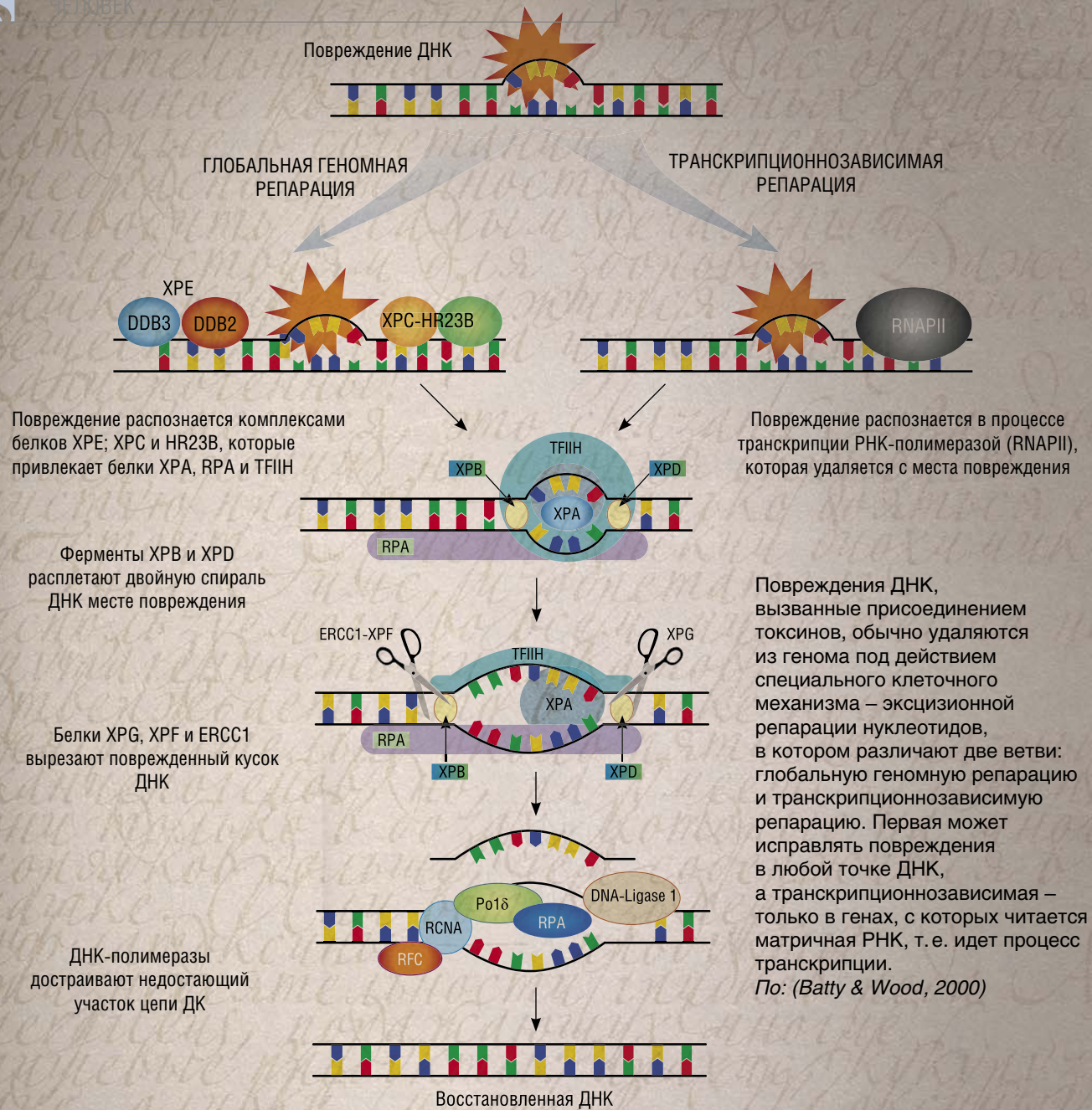
Такие наблюдения дали пищу для размышлений, но их, естественно, было недостаточно для доказательства роли аристороховых кислот в развитии балканской нефропатии. Искать токсин в продуктах питания представлялось невозможным: в хлебе, испеченном из привозного сырья, его нет, а муку полувековой давности не найти. Поэтому медики попытались сделать анализ на аддукты, который так успешно сработал в случае китайской травяной нефропатии. И это дало результат: в опухолевых и нормальных тканях коркового вещества почек пациентов даже спустя десятки лет после употребления приготовленного собственноручно хлеба были обнаружены аддукты аристороховых кислот с ДНК.

А еще исследователи провели множество экспериментов в лаборатории на животных и клеточных культурах, чтобы надежно доказать воздействие токсинов кирказона на клетку. Оказалось, что за нефротоксичность отвечает аристороховая кислота I, а за канцерогенность – обе формы токсина, т. е. и аристороховая кислота II. Почки специфично поражаются потому, что в клетках почечных канальцев есть специальные белки-транспортёры, которые выводят органические кислоты из крови в мочу – они захватывают молекулы аристороховой кислоты, которая затем взаимодействует со своими мишенями в клетках почечного эпителия.

## Где же был охранник?

Каждая девушка, – сказала она ему, – имеет свой интерес в жизни, и только одна я живу как ночной сторож при чужом складе. Или сделайте со мной что-нибудь, папаша, или я делаю конец моей жизни... И. Бабель. Одесские рассказы

Во всей этой истории с аристороховой кислотой один момент оставался совершенно непонятным. Известно, что аддукты ксенобиотиков с ДНК обычно быстро удаляются из генома под действием специального клеточного механизма – эксцизионной репарации нуклеотидов. Этот путь репарации задействован в случае повреждений, сильно искажающих структуру ДНК.



В нем различают две ветви: глобальную геномную репарацию и транскрипционнозависимую репарацию. Глобальная геномная репарация в принципе может исправлять повреждения в любой точке ДНК, а транскрипционнозависимая – только в генах, с которых читается матричная РНК, т.е. идет процесс транскрипции. В глобальной геномной репарации повреждение сначала узнается специальным комплексом из белков-сенсоров и белков, помогающих развернуть плотно упакованную структуру хроматина в хромосоме.

Эти действия служат сигналом для посадки еще двух белковых комплексов, среди которых имеются две ДНК-геликазы – ферменты, способные «расплести» двойную спираль ДНК, т.е. разделить ее на отдельные цепи. На следующем этапе специальные белки вырезают кусок ДНК, а ферменты ДНК-полимеразы достраивают недостающий участок, воссоздавая первоначальную последовательность. Второй путь репарации проще: повреждение здесь находит сама РНК-полимераза, которая попросту останавливается на месте повреждения в ходе транс-

крипции. «Застывшая» полимеразу убирается с аварийного участка специальными белками, а дальше все идет по схеме, описанной выше.

Почему же аддукты аристороховой кислоты не удаляются из ДНК системой репарации, сохраняясь там на десятки лет?

Оказалось, что они вообще ускользают от внимания глобальной геномной репарации: белки-сенсоры просто не «видят» и, соответственно, не связываются с двуцепочечной ДНК, содержащей такие аддукты. Возможно, это связано с какими-то структурными особенностями этой ДНК: как выяснилось, если системе репарации слегка «помочь», разрушив вокруг аддукта аристороховой кислоты водородные связи, то повреждение распознается прекрасно.

Что касается транскрипционнозависимой репарации, то она может распознавать ДНК, содержащие



Перезимовавший плод кирказона ломоносовидного (вверху) и половинка плода с семенами (внизу). Чувашия, окр. г. Шумерля, берег р. Сура перед Бобровскими песками. Фото С. Аполлонова

аддукты аристороховой кислоты, но работает только в том случае, если повреждена цепь ДНК, служащая матрицей для считывания РНК. Поэтому в работающих генах аддукты удаляются только из одной цепи, а в другой остаются, вызывая мутации.

Детективы-токсикологи даже пошли на огромный труд, полностью определив последовательности всех

генов в опухолях нескольких десятков человек, пострадавших от балканской эндемичной нефропатии и китайской травяной нефропатии. Оказалось, что большинство этих мутаций образовались в результате присоединения аристороховой кислоты к азотистому основанию аденину, находящемуся в составе «неработающей» цепи ДНК. Многие из обнаруженных мутаций затрагивали ген p53, один из главных онкосупрессоров в клетке – его инактивация наблюдается примерно в половине всех случаев рака.

Легко представить, что при регулярном употреблении с пищей малых количеств аристороховых кислот образовавшиеся повреждения ДНК, которые к тому же не «ремонтируются», спустя много лет могут привести к возникновению рака.



Гербарный образец кирказона обыкновенного (*Aristolochia clematitis* L.).  
Коллекция ЦСБС СО РАН (NS)

## Вместо эпилога: минздрав опять предупреждает

*Мониторинг за качеством блинов показывает, что они не ядовиты. Если вы боитесь изуродовать себе талию, ограничьте потребление блинов. Если будете потреблять запредельные дозы, это будет опасный продукт.*  
Г. Г. Онищенко, бывший главный санитарный врач РФ, ныне помощник Председателя Правительства РФ

Итак, преступник в деле балканской эндемичной нефропатии обнаружен, и вина, говоря судебным языком, доказана до степени «отсутствия разумных оснований для сомнения». Что же дальше? Какое дело рядовому российскому или американскому налогоплательщику до редкой балканской болезни, если он к тому же не лечится у китайских знахарей?

Ответ на этот вопрос очень прост. Механизм токсичности аристолоховых кислот, раскрытый американскими и хорватскими медиками, наверняка не ограничен только этими веществами. Напомним, что в той же утренней чашечке кофе содержится до пятисот канцерогенных веществ!

В 1964 г. главный санитарный врач США Л. Терри выпустил знаменитый отчет «Курение и здоровье», который подытожил долгие годы работы сотен врачей и ученых во всем мире. С тех пор Минздрав не устает предупреждать: курение вызывает рак. Наверное, невозможно посчитать, сколько этим предупреждением уже было спасено жизней, и какой экономический эффект они дали. Кстати сказать, нитрозамины – основные канцерогенные продукты сгорания табака, также образуют с ДНК аддукты, удаляемые системой эксцизионной репарации нуклеотидов. Можно поспорить, что исследования аристолоховых кислот тоже помогут предотвратить возникновение онкологических заболеваний у множества людей.

В Европе и в Америке использование кирказона в средствах народной медицины уже запрещено, хотя все эти травяные сборы можно легко купить через Интернет. Группа А. Гроллмана сейчас работает на Тайване, где китайская народная медицина пустила глубокие корни и сдаваться не собирается, особенно в сельской местности, где врачей немного. Именно поэтому частота рака верхнего отдела мочеполового тракта там самая высокая в мире.

Авторы будут считать свою цель достигнутой, если читатели поймут: все биологически активные вещества в растениях, какими бы целебными их не считала китайская, русская или бушменская народная медицина, появились в ходе эволюции для использования самим растением, а вовсе не для лечения человека. И даже если какое-то вещество действительно может служить нам лекарством, оно будет лучше работать в чистом виде и в тщательно отмеренной дозе. Поэтому не стоит заваривать премудрый травяной чай, помогающий от всего на свете, – лучше примите таблетку, созданную на основе долгих и глубоких научных исследований.



Авторы и редакция благодарят к. б. н. Е. Л. Королюк (Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск) за помощь в подготовке иллюстративного материала

*Лумература*  
Bamias G., Boletis J. Balkan nephropathy: Evolution of our knowledge // *Am. J. Kidney Dis.* 2008. V. 52. No. 3. P. 606–616.

Clyne M. Aristolochic acid – one of the most potent carcinogens known to man // *Nat. Rev. Urol.* 2013. V. 10. No. 10. P. 552.

Grollman A. P. Aristolochic acid nephropathy: Harbinger of a global iatrogenic disease // *Environ. Mol. Mutagen.* 2013. V. 54. No. 1. P. 1–7.

Lee W., Ladanyi M. Genomics traces carcinogen fingerprints // *Sci. Transl. Med.* 2013. V. 5. No. 197. Article No. 197fs31.