

К вопросу о развитии проблемы эффективности сверхмалых доз биологически активных соединений

И. П. Ашмарин, Е. П. Каразеева, Т. В. Лелекова

ИГОРЬ ПЕТРОВИЧ АШМАРИН — доктор биологических наук, профессор, академик РАМН, заведующий кафедрой физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова. Область научных интересов: нейрофизиология, нейропептиды.

119899 Москва, Ленинские горы, МГУ им. М. В. Ломоносова, тел./факс (095)939-33-55, E-mail ashmarin@3.human.bio.msu.ru

ЕЛЕНА ПАВЛОВНА КАРАЗЕЕВА — младший научный сотрудник кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова. Область научных интересов: нейрофизиология, нейропептиды.

ТАТЬЯНА ВЛАДИМИРОВНА ЛЕЛЕКОВА — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова. Область научных интересов: физиология сосудов.

Общезвестно, что проблема эффективности сверхмалых доз (СМД) и концентраций (СМК) биологически активных веществ в экспериментальном плане отличается деликатностью и даже определенной опасностью для репутации ученых, работающих в этой области. Исследования в данном направлении сопряжены с серьезными методическими трудностями. Работая с очень большими разбавлениями веществ, практически невозможно контролировать конечную концентрацию порядка 10^{-15} — 10^{-23} моль/л даже наиболее чувствительными современными методами. При использовании высокоразбавленных растворов чрезвычайно сложно избежать сорбции единичных молекул на стенках посуды. Возможны также сложные взаимодействия вещества с растворителем и даже с некоторыми примесями, содержащимися в применяемых растворителях. Наконец, даже нарушение рутинного требования — смены пипеток на каждом этапе разбавления — ведет к грубым ошибкам.

Еще больше осложняется ситуация при использовании СМД (СМК) веществ в клинических исследованиях. Хорошо известно, что даже простое *placebo* дает при лечении ряда заболеваний существенный клинический эффект. Для объяснения этого феномена выдвигался ряд серьезных гипотез. Основное объяснение — психотерапевтический эффект введения *placebo*. Вопрос эффективности малых доз особенно характерен для гомеопатического метода лечения. Многие гомеопатические средства применяются в таких низких разбавлениях, что организм больного практически не имеет шансов подвергнуться воздействию хотя бы одной молекулы соответствующего вещества в процессе лечения. Применительно к такому уровню концентраций (доз) не существует пока сколько-нибудь удовлетворительных объяснений декларируемых эффектов, кроме психотерапевтических.

Все это побуждает к повторному критическому обобщению накапливающихся материалов об эффективности действия веществ в сверхмалых дозах и концентрациях. Ряд обзоров и гипотез в этой области опубликован в 1990-1994 гг. Е.Б. Бурлаковой и соавт. [1], Л.А. Сазановым и С.В.Зайцевым [2], И.П. Ашмариным и соавт. [3, 4] и др. Проблема СМД и СМК были

посвящены международные конференции в Бордо и Москве (1990, 1993 гг.). Настоящая статья является очередным концептуальным обзором, включающим ряд материалов последних лет.

Сверхмалые концентрации и сверхмалые дозы

По мере развития биохимии и фармакологии представления о количественных характеристиках биологически активных веществ, в пределах которых они оказывают воздействие, быстро эволюционируют. Рабочие концентрации целого ряда внутренних биорегуляторов, например пептидов и собственных гормонов, нередко находятся в интервале 10^{-9} — 10^{-12} моль/л и даже менее. Эффективные дозы некоторых признанных лекарственных препаратов и токсинов значительно ниже 10^{-12} моль на 1 кг массы тела (см., например [5, 6]).

Попробуем уяснить, начиная с каких значений концентраций (доз) разумно пользоваться терминами с приставкой «сверх»? По-видимому, такие количественные обозначения целесообразно отнести к концентрациям и дозам, эффективность которых трудно объяснить с позиции современных положений биохимии, молекулярной биологии и физической химии.

Одним из главных критериев оценки эффективной концентрации (дозы) биологически активных веществ может быть сродство клеточных рецепторов к своим лигандам, которое характеризуется, в частности, константой диссоциации K_D лиганд-рецепторного комплекса. В определенных условиях константа K_D соответствует концентрации лиганда, связывающего 50 % присутствующих рецепторов.

Большинство известных лиганд-рецепторных взаимодействий характеризуется K_D в интервале 10^{-6} — 10^{-12} моль/л. Имеются, однако, сведения о существовании так называемых супераффинных рецепторов, образующих комплексы с K_D менее 10^{-12} моль/л. Крайняя ограниченность данных о существовании таких рецепторов связана, по-видимому, не столько с их редкостью, сколько с методическими трудностями их выявления и определения характеристик. Примером

супераффинных рецепторов служит брадикинин. Открытие этих рецепторов стало возможным лишь при использовании особенно «горячих» радиоактивных лигандов. Константа K_D для этих рецепторов составляет $7,5 \cdot 10^{-13}$ моль/л [7].

Значительным вкладом в проблему явились исследования С.В. Зайцева с сотруд., установивших существование супераффинных рецепторов опиоидных пептидов с K_D около 10^{-14} моль/л [8, 9]. Можно полагать, что в ближайшие годы будут сделаны новые открытия в этой области. Последние достижения позволяют понять эффективность ряда регуляторных соединений в концентрациях порядка 10^{-15} моль/л, но данные об эффективности концентраций 10^{-16} моль/л и менее вызывают по-прежнему определенное недоумение и осторожность. Пока можно принять в качестве условного пограничного значения концентрации (разумеется, временного), ниже которого разумно употреблять понятие СМК, — 10^{-15} моль/л.

Еще труднее определить соответствующее пограничное значение для доз лекарственных веществ. Фармакодинамические закономерности для лекарственных веществ довольно сложные и установить четкое соотношение дозы с эффективными концентрациями вводимых веществ в зоне внутренних «мишеней» крайне затруднительно, а нередко и просто невозможно. Наконец, неясно, какой вклад в конечный эффект вносит начальная концентрация лекарственного вещества в зоне введения. Очевидно, она выше расчетной концентрации (на 1 кг массы тела). Поэтому очень условным эмпирическим ориентиром для СМД можно считать дозы меньшие 10^{-15} моль на 1 кг массы тела.

Обозначив верхнюю границу СМК и СМД, обратимся к вопросу о нижнем пределе. Здесь опять-таки строгое научно обоснованное определение крайне затруднительно. Можно лишь отметить неподдающуюся истолкованию ситуацию, когда концентрации действующего вещества столь малы, что вероятность встречи рецептора с соответствующим лигандом составляет менее 1%. Если учесть реальный объем внутриклеточных жидкостей, с которыми контактирует рецептор, то можно полагать, что предельно низкие концентрации близки к 10^{-20} моль/л, но в особых случаях могут быть и ниже.

Таким образом, на основании приведенных рассуждений за действующие сверхмалые концентрации (дозы) биологически активных веществ можно принять интервал 10^{-15} — 10^{-20} моль/л (моль/кг).

Настоящая статья посвящена рассмотрению данных об эффективности концентраций преимущественно в этом интервале.

Канальный и гуморальный способы передачи информации в организме

Проблема эффективности СМК и СМД связана с наличием двух принципиально различных систем передачи информации в организме — канальной и гуморальной.

Передача сигналов по нервной системе осуществляется по узконаправленным проводникам. Правда, существуют зоны контакта между элементами нервной системы — химические синапсы, которые «приоткрыты» для внешних гуморальных влияний. Однако передача сигнала происходит, как правило, при вы-

бросе в синаптическую щель нейротрансмиттеров и котрансмиттеров в таких количествах, которые временно создают довольно высокие концентрации (наиболее яркий пример — ацетилхолин — до 10^{-4} — 10^{-5} моль/л). Эти концентрации нет оснований относить к СМК. Такая ситуация характерна и для канальной передачи информации через системы прямых контактов между нервными клетками.

Иначе обстоит дело с гуморальной передачей сигналов, осуществляемой гормонами и другими регуляторными соединениями через плазму крови, цереброспинальную жидкость, межклеточные среды и т.п. В этом случае способность клетки, клеточной мембраны, рецептора реагировать на чрезвычайно низкие концентрации регулятора приобретает особое значение. Именно в такой системе регуляции широко представлены соединения, эффективные в СМК. Наконец, восприятие внешних химических сигналов — ароматические вещества, феромоны и т.п. — опять-таки требует наличия внешних систем, реагирующих на СМК и СМД.

Системы, необходимые для реализации эффектов СМК и СМД

Можно назвать, по крайней мере, четыре системы, необходимые для реализации эффектов СМК и СМД:

- а) каскадные системы, амплифицирующие сигнал;
- б) собирательные, конвергентные системы;
- в) накопители и транспортеры сигнальных молекул;
- г) супераффинные рецепторы.

Каскадные усиливающие системы существуют на молекулярном, клеточном и межклеточном уровнях. Нет необходимости характеризовать здесь хорошо изученные каскадные процессы в рецепторных системах различного типа, когда при воздействии единичных молекул лиганда на каждом последующем этапе его связывания с рецептором внутри клетки образуются промежуточные сигнальные молекулы (вторичные мессенджеры), число которых на много порядков выше, чем на предшествующем этапе. Амплификация сигнала осуществляется и в разветвляющихся нейрональных сетях, т.е. на клеточном уровне.

Менее развиты представления о конвергентных системах, реагирующих на единичные сигнальные молекулы. На клеточном уровне основой таких систем служит множество (сотни, тысячи) одинаковых рецепторов на клетке-мишени. Включение любого из них достаточно для физиологического ответа клетки (гипотеза «рецепторного резерва», или избытка связывающих мест и т.п. [2]).

Что касается надклеточного уровня, то особенно показательны центростремительные, собирательные варианты нейрональных систем (см. схему). В таких системах очень большое число однотипных нейронов (обозначенных как нейроны первого порядка — nI) объединены конвергирующей системой связей с нейронами следующего порядка — nII и $nIII$, которые обеспечивают физиологический ответ. Нейроны nI расположены в определенном общем объеме межклеточной жидкости, причем каждому нейрону соответствует одинаковый парциальный объем среды. Число сигнальных молекул (СМ) значительно меньше числа нейронов nI .

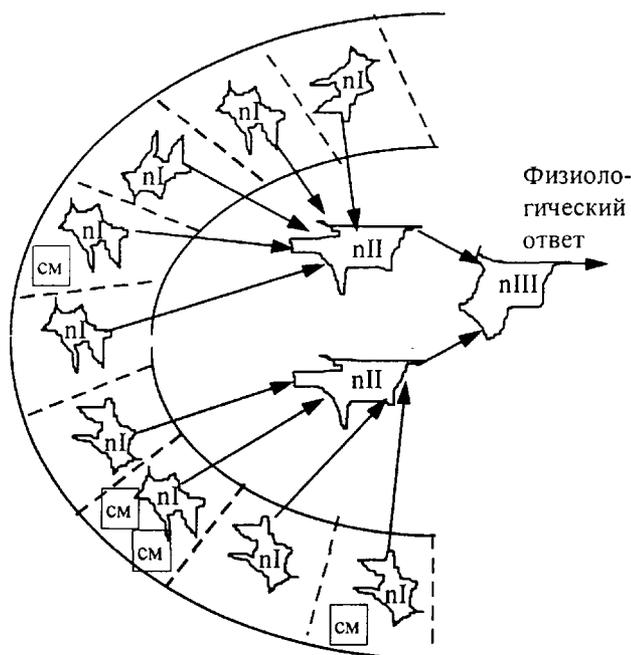


Схема индукции физиологического ответа малыми концентрациями сигнальных молекул (СМ) посредством возбуждения единичных нейронов первого порядка (nI) с последующей передачей сигнала на "собирающие" нейроны высших порядков (nII, nIII)

Продемонстрируем возможности функционирования такой сигнальной системы. Если, например, принять число нейронов nI близким к 10^5 , а общий объем межклеточной среды, в которой они расположены, равным 1 мкл, то при числе сигнальных молекул $\sim 10^3$ (концентрация порядка 10^{-15} моль/л) вероятность вхождения СМ в парциальный объем нейрона будет подчиняться закону редких событий (распределение Пуассона). Приведенное количественное соотношение (10^3 молекул на 1 мкл) означает, что в каждый момент времени в парциальном объеме среды, окружающей подавляющее большинство нейронов, как правило, не будет ни одной СМ. Однако закон Пуассона позволяет показать, что до 10 из 10^5 нейронов окажутся в объеме, где находится одна или более СМ. Временная концентрация сигнальных молекул в парциальном объеме нейрона будет, таким образом, значительно больше, чем концентрация их в общем объеме, и приблизится к минимальному значению K_D лиганд-рецепторных комплексов. В этих условиях вероятна реакция единичных нейронов первого порядка.

Благодаря системе конвергирующих межнейронных связей, когда возбуждение любого из нейронов первого порядка достаточно для возбуждения нейронов второго, третьего или других высших порядков, достигается конечный физиологический эффект. Заметим, что по современным данным число нейронов первого порядка, которые могут находиться в контакте с одним из нейронов второго или третьего порядка в конвергирующей схеме, может быть очень велико: число синапсов на одном нейроне измеряется сотнями и даже тысячами.

Представленная собирательная, «улавливающая» система иллюстрирует одну из возможностей реализации очень низких концентраций биологически активных веществ даже при взаимодействии с обычными рецепторами, не обладающими супераффинностью по отношению к своим лигандам. По-видимому, только

действием такого рода систем можно объяснить, например, феномен, когда интерлейкин-1 и вещество Р проявляют биологическую активность при концентрации в 10^3 раз меньшей, чем K_D соответствующих рецепторов [10].

В последние десятилетия собраны обширные данные о различных высокоаффинных акцепторах, которые не являются рецепторами в принятом смысле этого понятия, т.е. они не объединяют в одно надмолекулярное образование участки связывания с лигандом и систему первичной реализации сигнала. К таким акцепторам относятся разнообразные транспортные белки плазмы, защищающие пептидные гормоны от деградации на их пути к клеткам-мишеням, белки-акцепторы одорантов и феромонов, белки, способные связывать и временно накапливать стероидные гормоны, и др. [6]. Все они в принципе могут временно накапливать сигнальные молекулы и, мигрируя далее в зону расположения соответствующего рецептора, способствуют его включению даже в условиях, когда первичная концентрация СМ чрезвычайно мала. Высказывалось также предположение о накопительной функции гликолипидов, сопряженных с рядом рецепторов, например цереброзидов, связывающих энкефалины.

Что касается чрезвычайно высокой чувствительности к одорантам и феромонам, то до сих пор не имеет исчерпывающего толкования факт включения сигнала от клеток, взаимодействующих с этими веществами в концентрациях, допускающих лишь единичные столкновения с клеткой. Известно, однако, что одоранты и феромоны первично взаимодействуют со специализированными молекулами-переносчиками, которые в конечном счете либо доносят СМ до рецептора, либо модифицируются таким образом, что приобретают способность включить рецептор при контакте с ним. К сожалению, даже полуколичественные оценки здесь пока крайне затруднительны.

Для понимания механизмов действия СМК определенное значение может иметь и открытие рецепторов, претерпевающих необратимые изменения (в течение относительно длительного промежутка времени) после взаимодействия с лигандом. Примером могут служить рецепторы, расщепляемые тромбином [11]. Необратимые взаимодействия лиганда ведут к неравновесным процессам, которые могут значительно снизить эффективные концентрации лиганда [1, 2].

Представленный в настоящем разделе материал позволяет в целом наметить пути истолкования эффектов, возникающих при концентрации регуляторов, существенно меньших 10^{-12} моль/л. Можно полагать, что сведения о существовании супераффинных рецепторов в сочетании с представлениями о конвергентных, накопительных и транспортирующих системах усиления сигнала позволят в близком будущем дать строгое объяснение эффектов концентрации порядка 10^{-15} — 10^{-20} моль/л.

Экспериментальные данные об эффективности сверхмалых концентраций

Ниже кратко суммирована часть экспериментальных материалов об эффектах СМК в пределах 10^{-12} — 10^{-20} моль/л. При этом основное внимание направлено на такие эндогенные факторы, как регуляторные пептиды. В табл. 1 для многих семейств регуляторных пептидов указаны функции, реализуемые при СМК. Мы считаем, что именно эти функции входят в число наиболее

Примеры минимальных действующих концентраций $C_{мин}$ биологически активных веществ

| Вещество | $C_{мин}$, моль/л | Эффект | Ссылка |
|--|-------------------------|--|----------|
| Пептиды | | | |
| Эндотелин | 10^{-15} | Коронарорасширяющее действие (противоположное действие при 10^{-12} моль/л) | [12] |
| | 10^{-12} | Коронаросуживающее действие, увеличение кровяного давления (крыса) | [13] |
| | 10^{-10} | Бронхоконстрикция (морская свинка) | [14] |
| | 10^{-12} | Действие на электрозависимые Ca^{2+} -каналы бронхов | [15] |
| | 10^{-13} — 10^{-15} | Стимуляция сокращений лимфатических сосудов | [16] |
| Вещество P | 10^{-14} | Стимуляция роста клеток спинного мозга (в культуре) | [17] |
| АКТГ ₄₋₁₀ (MQHFPG) | 10^{-12} | Рост нейритов спинальных нейронов | [18] |
| Аналог АКТГ ₄₋₁₀ (НОЕ-427) | 10^{-12} | Облегчение реакции пассивного избегания | [4] |
| Мет- и лей-энкефалины | 10^{-17} | НК ^a -активность, антителообразование (человек) | [19, 20] |
| Мет-энкефалин | 10^{-14} | Модуляция бласттрансформации спленоцитов (мыши) | [8] |
| Динорфин, β -эндорфин, морфин | 10^{-14} | Респираторный взрыв нейтрофилов | [2] |
| D-Ала-мет-энкефалинамид | 10^{-15} | Угнетение дыхательного взрыва нейтрофилов (человек) | [2, 9] |
| β -Эндорфин | 10^{-14} , 10^{-18} | Активация НК-лимфоцитов и антителообразования (клетки крови человека) | [21, 22] |
| | 10^{-17} | Антителообразование (мыши) | [23, 24] |
| β -Эндорфин, мет-энкефалин, PGE ₂ | 10^{-14} | Продукция хемотаксического фактора | [25] |
| α - и β -Эндорфины, мет-энкефалин | 10^{-17} | Антителообразование (человек) | [20] |
| Вазотоцин | 10^{-14} | Снижение скорости фильтрации в почках | [26] |
| Arg-вазопрессин | 10^{-13} | Увеличение концентрации мочи (собака) | [27] |
| | 10^{-13} — 10^{-19} | Модуляция K ⁺ -тока, блокирование Ca ²⁺ -тока в мембране нейрона | [28] |
| Соматолиберин | 10^{-15} | Увеличение синтеза мРНК. Выделение гормона роста (крысы) | [29] |
| Ко-кальцигенин (CGRP) | 10^{-10} — 10^{-12} | Расширение артериол кожи | [30] |
| Брадикинин | 10^{-16} | Модуляция сосудистой проницаемости | [31] |
| Атриопептид | 10^{-12} | Увеличение Na ⁺ -уреза (собака) | [32] |
| | 10^{-13} | Угнетение выхода ренина из юкстагломерулярных клеток | [33] |
| Тимозин- α_1 | 10^{-13} | Ингибирование Na ⁺ /H ⁺ обмена в тучных клетках | [34, 35] |
| Кардиоактивный пептид В моллюсков | 10^{-14} | Угнетение двигательного рефлекса (аплизия) | [36] |
| Вазоактивный интестинальный пептид | 10^{-14} | Стимуляция миграции лимфоцитов | [37] |
| T-активин | 10^{-15} | Стимуляция реакции розеткообразования лимфоцитов | [38] |
| Туморнекротический фактор + адриамицин | 10^{-15} | Подавление опухолевых клеток | [39] |
| Интерлейкин-1 | 10^{-14} | Продукция интерлейкина-2 в лимфоцитах | [40] |
| Фактор роста опухолей | 10^{-15} | Хемотаксис нейтрофилов | [41] |
| Гормон роста | 10^{-15} | Флуоресценция в мембранах эритроцитов | [2] |
| Вещества непептидной природы | | | |
| Форболовый эфир | 10^{-15} | Модификация биомембран | [42] |
| Фенозан | 10^{-12} | Влияние на алкогольную интоксикацию | [43] |
| Антиоксиданты ^б | 10^{-17} | Влияние на активность изолированного нейрона улитки | [44] |
| Нитрозодиметилмочевина | 10^{-24} — 10^{-29} | Прорастание семян, резистентность клеток | [1] |

^a НК — естественные киллеры. ^б 6-Метил-2-этил-3-оксипиридин, хлоридрат; 4-окси-3,5-дитретбутил- α -метилбензиламин, хлоридрат.

Примеры минимальных действующих концентраций $C_{\text{мин}}$ регуляторных пептидов на сократительную активность лимфатических сосудов брыжейки крысы

| Пептид | $C_{\text{мин}}$, моль/л | Инкремент частоты сокращений сосуда в минуту | Увеличение амплитуды сокращений | Изменение тонуса | |
|--------------------------------------|---------------------------|--|---------------------------------|--------------------|--------------------|
| | | | | дилатация | констрикция |
| Ангиотензин I | $\leq 10^{-20}$ | $17 \pm 4,3$ | +++ | 0 | +++ |
| Ангиотензин II | $\leq 10^{-20}$ | $9 \pm 1,1$ | ++ | 0 | ++ |
| Амилин | 10^{-13} | $6 \pm 0,9$ | +++ | 0 | ++ |
| АКТГ (4-9) (M-Q-H-F-P-G) | 10^{-14} | $19 \pm 3,8$ | ++ | + [†]) | + [†]) |
| FMRF(амид) | 10^{-19*} | $16 \pm 2,4$ | ++++ | 0 | +++ |
| Производные FMRF(амид): | | | | | |
| HYGGFMRF(амид) | 10^{-15*} | $14 \pm 3,0$ | ++++ | 0 | +++ |
| HYGGFMRF(OH) | 10^{-19*} | $18 \pm 4,1$ | + | 0 | + |
| HYGGFMRL(амид) | 10^{-17*} | $12 \pm 1,5$ | + | 0 | + |
| YMRF(амид) | 10^{-16*} | $7 \pm 0,9$ | + | 0 | + |
| RF · 2HCl | 10^{-15*} | $6 \pm 1,3$ | + | 0 | + |
| Эндотелин -I | $\leq 10^{-20}$ | $20 \pm 1,6$ | ++ | ++++ | 0 |
| Тиролиберин | 10^{-18} | $21 \pm 4,7$ | ++++ | ++ | 0 |
| Дефенсин | 10^{-15} | $11 \pm 1,2$ | +++ | ++ | 0 |
| Тафцин | 10^{-12} | 0 | - | ++ | 0 |
| МИФ (P-L-G-NH ₂) | 10^{-18} | $17 \pm 3,1$ | +++ | ++ | 0 |
| Брадикинин | 10^{-18} | $7 \pm 0,7$ | ++++ | ++ | 0 |
| Фрагмент брадикинина (PPGFSP) | $\leq 10^{-20}$ | $20 \pm 4,4$ | ++++ | ++++ | 0 |
| Пентагастрин | 10^{-13} | $9 \pm 1,1$ | ++ | 0 | ++ |
| Аналоги пентагастрина: | | | | | |
| DHO | 10^{-13} | $8 \pm 2,0$ | + | 0 | 0 |
| LR 261 | 10^{-13} | $8 \pm 1,7$ | + | 0 | 0 |
| Простейшие пролинсодержащие пептиды: | | | | | |
| G-P | 10^{-19} | $19 \pm 3,0$ | +++ | +++ | 0 |
| P-G-P | 10^{-19} | $10 \pm 1,3$ | ++ | +++ [†]) | ++ [†]) |
| P-G | 10^{-19} | $14 \pm 2,8$ | ++ | +++ [†]) | + [†]) |
| P-Y | 10^{-13} | $15,5 \pm 3,9$ | +++ | ++ | 0 |
| R-P-G-P(NH ₂) | $\leq 10^{-20}$ | $9 \pm 0,9$ | ++++ | ++ [†]) | +++ [†]) |
| G-P-G-G | 10^{-16} | $12 \pm 2,1$ | +++ | ++ | 0 |
| W-P | 10^{-17*} | $8 \pm 1,6$ | ++ | +++ | 0 |
| G-P-R-P | 10^{-15} | $13 \pm 2,2$ | + | +++ | 0 |
| P-M | $\leq 10^{-20}$ | $10 \pm 2,9$ | ++ | ++ | 0 |
| P-F-P | 10^{-16} | $12 \pm 1,2$ | ++ | ++ | 0 |
| A-P | 10^{-18} | $7 \pm 0,9$ | ++ | ++ | 0 |
| P-G-P-Y(OH) | $\leq 10^{-20}$ | $12 \pm 0,8$ | ++ | ++ | 0 |
| P-W | $\leq 10^{-20}$ | $16 \pm 3,1$ | + | ++ [†]) | ++ [†]) |
| G-P-R-P(NH ₂) | $\leq 10^{-20}$ | $11 \pm 1,0$ | + | ++ | 0 |
| P-S-P | 10^{-18} | $10 \pm 2,1$ | + | ++ | 0 |
| P-F | 10^{-18} | $11 \pm 2,9$ | + | ++ | 0 |
| V-P | 10^{-19} | $12 \pm 1,6$ | + | + | 0 |
| P-L | 10^{-18} | $9 \pm 1,1$ | + | + | 0 |
| P-I | 10^{-15} | $15 \pm 2,6$ | + | + | 0 |
| P-S | 10^{-15} | $11 \pm 3,2$ | + | + | 0 |

+ стимуляция (+ $\leq 20\%$, ++ >20 и $<35\%$, +++ ≥ 35 и $\leq 50\%$, ++++ $> 50\%$; - торможение; * стимулирует только спонтанно активные сосуды; [†]) — периодическое изменение тонуса.

специфических активностей соответствующих пептидов. Сравнение данных табл. 1 с аналогичными материалами, приведенными в предшествующих обзорах, дает основание полагать, что практически в пределах каждого семейства эндогенных регуляторов при углубленном их исследовании можно прогнозировать функции, реализуемые при сверхмалых концентрациях.

Особенно удачной моделью для изучения эффектов СМК пептидов оказалась система мезентериальных лимфатических сосудов *in vivo*. В соответствующих экспериментах растворы пептидов наносились непосредственно на брыжейку [45–47]. Как видно из табл. 2, характерным эффектом пептидов является стимулирующее влияние на амплитуду и частоту сокращений в минимальных действующих концентрациях порядка 10^{-13} – 10^{-20} моль/л. Кроме того, часть пептидов обладает констрикторным действием, а часть вызывает и дилататорный эффект. Интересно также, что тиролиберин способен вызывать мембранные эффекты в концентрациях 10^{-4} – 10^{-18} моль/л. Так, методом спиновых зондов показано, что действие тиролиберина (10^{-4} – 10^{-18} моль/л) сопровождается снижением микровязкости липидного бислоя на поверхности мембраны эндоплазматического ретикулума клеток печени мыши. Наибольший эффект (35%) отмечен для концентраций 10^{-10} и 10^{-16} моль/л [48]. На мембране клетки миокарда морской свинки тиролиберин в концентрации 10^{-15} моль/л оказывает выраженный инотропный эффект (эффект на амплитуду мышечных сокращений) [49].

Особого внимания заслуживают приводимые во многих обзорах данные об особой чувствительности систем восприятия запахов, феромонов и т.п. Например, из расчетов, опубликованных в 1971 г. Кайслингом [50], следует, что реакции самцов тутового шелкопряда возникают, когда на одну сенсиллу приходится менее одной молекулы на рецептор.

Противоречия между эффективностью минимальных концентраций регуляторных пептидов и эндогенными их концентрациями в жидкостях организма

Обращает на себя внимание тот парадоксальный факт, что значения эффективных СМК (см. табл. 1) оказываются нередко гораздо ниже тотальных концентраций соответствующих эндогенных регуляторов в плазме крови и цереброспинальной жидкости (ЦСЖ). Как правило, концентрация регуляторных пептидов в жидкостях организма находится в интервале 10^{-7} – 10^{-17} моль/л, а для таких регуляторов, как тафцин, она достигает $4 \cdot 10^{-7}$ моль/л. Сходная ситуация обнаруживается при сопоставлении тотальных концентраций эндогенных регуляторов с теми приращениями концентрации, которые могут возникать при введении извне тех же соединений в дозах, достаточных для физиологического ответа. Расчетные данные для некоторых таких ситуаций представлены в табл. 3. Для объяснения этого противоречия выдвинуты две основные гипотезы.

Первая гипотеза исходит из того, что большинство регуляторных пептидов содержится в плазме крови и ЦСЖ не в свободном виде, а в виде прочных комплексов со специфическими белками-носителями. Ранее были известны лишь нейрофизины — носители вазопрессина и окситоцина. Сейчас набор молекулярных носителей пептидов исчисляется десятками белков [3] и постоянно возрастает. Константа диссоциации K_D комплексов пептидов с белками-носителями, естественно, несколько выше, чем K_D комплексов с соответствующими клеточными рецепторами. В противном случае невозможен бы переход регуляторных пептидов на рецептор после завершения транспорта их к клеткам-мишеням. Тем не менее значения K_D пептид-белкового комплекса могут быть столь низкими, что реальные концентрации пептидов в плазме будут на несколько порядков ниже тотальной их концентрации.

Таблица 3

Соотношения между физиологически эффективным приращением концентрации пептидов и их тотальной концентрацией в плазме и цереброспинальной жидкости (ЦСЖ)

| Пептид | Уровень концентрации в плазме или ЦСЖ, 10^{-12} моль/л | Приращение концентрации при экзогенном введении пептида, 10^{-12} моль/л | Физиологический ответ |
|-----------------------|--|--|--|
| Arg-вазопрессин | 2-3, плазма (человек, крыса) | 0,12–0,18 | Подавление диуреза и реакции активного избегания |
| Ко-кальцигенин (CGRP) | 20, плазма (человек) | 0,015 | Расширение подкожных артериол |
| β-Эндорфин | 5, плазма (человек) | 0,01 | Активация НК-лимфоцитов, возрастание содержания АКТГ, пролактина и альдостерона в плазме |
| | 75–150, плазма (крыса) | 0,3 | Ингибирование секреции катехоламинов |
| Холецистокинин | 1900–19000, ЦСЖ (крыса) | 94 | Подавление двигательной активности, модуляция реакции пассивного избегания |
| Тиролиберин | 200–250, плазма (крыса) | 0,002–0,0002 | Стимуляция сократимости лимфатических сосудов |
| Тафцин | 500000, плазма (крыса) | 2 | Подавление сократительной активности лимфатических сосудов |

Здесь следует остановиться на определении тотальных концентраций регуляторных пептидов в жидкостях организма. В существующих процедурах плазма крови или ЦСЖ, как правило, предварительно обрабатывается депротеинизирующими агентами (этанол, ацетон и др.), которые денатурируют комплексы регуляторных пептидов со своими белками-носителями, что приводит к освобождению пептидов. Если же операция депротеинизации не проводится, то распределение регуляторных пептидов между белками-носителями и специфическими антителами, применяемыми при иммунохимическом определении концентрации, может принимать столь сложные формы, что результат все равно не будет отражать действительной концентрации свободного пептида. Следует признать, что в настоящее время не разработана адекватная процедура, гарантирующая точное определение концентрации свободного регуляторного пептида в жидкостях организма. Таким образом, есть основание считать, что противоречия между данными о тотальных концентрациях регуляторных пептидов и их минимальными эффективными концентрациями обусловлены циркуляцией пептидов не в свободном виде, а в комплексах со специфическими белками-носителями.

Вторая гипотеза, разработанная С.В.Зайцевым и соавт. [2], основана на предположении об адаптации клетки к определенному относительно высокому уровню концентрации вещества и на представлении о существовании быстрой и медленной реакций с добавляемым на этом фоне веществом, эффект которого может быть даже разнонаправленным. Эта гипотеза привлекательна также тем, что позволяет объяснить полимодальные зависимости эффекта от дозы. Авторы представили ряд экспериментальных данных, полученных *in vitro* в опытах с клеточными суспензиями, хорошо согласующиеся с гипотезой [8, 9], что позволяет считать ее справедливой для ряда ситуаций. Однако большие трудности возникают при распространении этой гипотезы на ситуации *in vivo*. В организме постоянно имеют место флуктуации средних тотальных концентраций регуляторных веществ и они достигают 3—15%. Поэтому без привлечения первой гипотезы (о роли белков-носителей) не представляется возможным объяснить эффекты изменения концентраций, измеряемых долями процента.

Таким образом, первая гипотеза сама по себе или в сочетании со второй может объяснить феномен эффектов сверхмалых концентраций биорегуляторов на фоне тотальных эндогенных концентраций. Очевидно также, что необходима дальнейшая экспериментальная разработка этого вопроса.

На основании приведенного рассмотрения экспериментальных данных об эффектах сверхмалых концентраций и доз регуляторных пептидов, некоторых других биологически активных соединений и имеющих в настоящее время теоретических представлений о природе этого явления можно заключить, что эффекты концентраций в интервале 10^{-15} — 10^{-20} моль/л объяснимы, если допустить раздельное или комплексное действие трех механизмов:

1) функционирование супераффиновых рецепторов с K_D до 10^{-13} — 10^{-14} моль/л;

2) действие каскадных механизмов усиления и конвергенции сигнала, особенно эффективных в усло-

виях неравномерного распределения редких сигнальных молекул возле клеток, являющихся первичными мишенями;

3) существование молекул-акцепторов, способных накапливать циркулирующие сигнальные молекулы.

Основное противоречие заключается в проявлении эффектов регуляторных пептидов в концентрации 10^{-12} — 10^{-18} моль/л при наличии средних тотальных концентраций многих из них в плазме крови и ЦСЖ, которые намного выше — 10^{-9} — 10^{-11} моль/л; эффективное приращение концентраций составляет лишь доли процента. Действие столь малых приростов концентраций можно объяснить тем, что тотальные концентрации регуляторных пептидов в жидкостях организма намного выше концентраций свободных пептидов, так как большая часть их транспортируется в виде комплексов со специфическими белками-носителями.

В целом, познание механизмов действия сверхмалых доз и концентраций в интервале 10^{-15} — 10^{-20} моль/л еще не закончено, хотя уже нет оснований относить эти эффекты к категории загадочных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 96-15-97861).

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Худяков И.В. Изв. АН СССР. Сер биол., 1990, № 2, с. 184—193.
2. Сазанов Л.А., Зайцев С.В. Биохимия, 1992, т. 57, № 10, с. 1443—1460.
3. Ашмарин И.П., Лелекова Т.В., Санжиева Л.Ц. Изв. АН, 1992, № 4, с. 531—536.
4. Wolterink G., Van Ree J.M., De Wied D. Life Sci., 1991, v. 48 № 2, p. 155—161.
5. Dolly J.O., Poulain B., Maisey E.A. e. a. In: Neurotoxins in neurochemistry. Ed. J.O. Dolly N.-Y.: John Wiley & Sons. 1988, p. 79—99.
6. Розен В.Б., Матарадзе Г.В., Смирнова О.В., Смирнов А.Н. Половая дифференцировка функций печени. М.: Медицина, 1991, 336 с.
7. Leibman C., Bosse R., Escher E. In: 13-th Amer. Peptide Symp., 1993, Abstract N P346.
8. Zaitsev S.V., Khagai L.A., Kim B.B. e. a. Immunol. Letters, 1992, v. 32, p. 27—30.
9. Efanov A.M., Koshkin A.A., Sazanov L.A. e. a. FEBS Letters, 1994, v. 355, p. 114—116.
10. Rameshwar P., Ganea D., Gascon P. J.Immunol., 1994, v. 152, № 8, p. 4044—4054.
11. Coughlin S.R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1994, v. 91, p. 9200.
12. Medvedeva N.A., Shaffer R.A., Medvedev O.S., Lewis S.J. Bul. Exp. Biol. Med.(Engl.) 1992, v. 114, № 9, p. 1263—1268.
13. Le Monnier de Gouville A.C., Lippington H.L., Cavero J. e.a. Life Sci., 1989, v. 45, № 17, p. 1499—1513.
14. Payne A.N., Whittle B. Eur. J. Pharmacol., 1988, v. 13, p. 201—206.
15. Advenier C., Sarria B., Naline E. e. a. Br. J. Pharmacol., 1990, v. 100, p. 168—172.
16. Fortes Z.B., Scivoletto R., Garcia-Leme J. Eur. J. Pharmacol., 1989, v. 170, № 1-2, p. 69—73.
17. Козлова М.В., Ильинский О.Б., Каленчук В.У., Кондрикова Е.С. Нейрофизиология, 1986, т. 18, № 5, с. 610—615.
18. Van Der Neut R., Bar P.R., Sodaar P., Gispen W.H. Peptides, 1988, v. 9, p. 1015—1020.
19. Faith R.E., Liang H.J., Murgu A.G., Plotnicoff N.P. Clin. Immunol. and Immunopathol., 1984, v. 31, p. 412—418.

20. Munn N.A., Lum L.G. *Ibid.*, 1989, v. 52, № 3, p. 376—385.
21. Mathews P.M., Froelich C.J., Sibbit W.L., Bankhurst A.D. *J. Immunol.*, 1983, v. 130, p. 1658—1662.
22. Williamson S.A., Knight R.A., Lightman S.I., Hobbs J.R. *Immunology*, 1989, v. 65, № 1, p. 47—51.
23. Захарова Л.А., Белевская Р.Г., Михайлова А.А. *Бюл. экспер. биологии и медицины*, 1988, т. 105, № 1, с. 50.
24. Zakharova L.A., Belevskaya R.G., Yanovskii O.G. *Biomed. Sci.*, 1990, v. 1, № 2, p. 139—143.
25. Brown S. L., van Epps D. E. *J. Immunol.*, 1985, v. 134, p. 3384—3390.
26. Gray D.A., Erasmus T. *Am. J. Physiol.*, 1988, v. 120, p. 231.
27. Baerwolff M., Bie P. *Ibid.*, 1988, v. 255, № 6, Pt. 2, p. R940—R945.
28. Артемьев И.Ю., Даринский Ю.А., Сологуб М.И., Ложкина Т.К. *Бюл. экспер. биологии и медицины*, 1991, т. 111, № 2, с. 115—116.
29. Gick G.G., Zeytin F.N., Brazean P. e. a. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1984, v. 81, № 5, p. 1553.
30. Brain S.D., Williams T.J., Tippins J.R. e. a. *Nature*, 1985, v. 313, № 3, p. 54—56.
31. Игнатъева И.Р., Чернух А.М., Гомазков О.А., Горизонтова М.П. *Патол. физиол. и экспер. терапия*, 1982, т. 2, с. 91.
32. Cernases P., Mathier E., Crawhall J.C., Levy M. *Am. J. Physiol.*, 1988, v. 255, p. R929—R935.
33. Kurtz A., Bruna R.D., Pfeilschifter J. e. a. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1986, v. 83, p. 4769—4773.
34. Струкова С.М., Киреева Е.Г., Спирина С.М. и др. *Биохимия*, 1989, т. 306, № 1, p. 229—232.
35. Dugina T.N., Strukova S.M., Khalgatyan C.V., Ashmarin I.P. *Byull. Eksperim. Biologii i Med.*, 1992, v. 114, № 9, p. 260.
36. Cawtrophe D., Higgins A., Lukowiak K. *Can. J. Physiol. and Pharmacol.*, 1989, v. 67, № 5, p. 89.
37. Bondesson L., Norolind K., Liden S. e. a. *Acta Physiol. Scand.*, 1991, p. 477—481.
38. Гладышева Т.Б., Конрадов А.А., Лебедев К.А. *Биофизика*, 1989, т. 34, № 5, p. 833—834.
39. Safrin J., Tsuchitani T., Zigelboim J., Bonavida B. In: *Ultra Low Doses*. Ed. C. Dautrempuich, London, Washington, DC, Taylor & Francis, 1991, p. 27.
40. Klarinet J.P., Kern D.E., Dower S.K. e. a. *J. Immunol.*, 1989, v. 142, № 7, p. 2187—2191.
41. Reibman J., Meixler S., Lee T.C. e. a. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1991, v. 88, № 15, p. 6805—6809.
42. Пальмина Н.П., Богданова Н.Г., Мальцева Е.Л., Пыльзарь Е.И. *Биологические мембраны*, 1992, т. 9, № 2, с. 810—820.
43. Золотая Р.Д., Миненкова У.А., Евсеев Л.С. *Изв. АН СССР. Сер. биол.*, 1990, т. 2, с. 302—308.
44. Бурлакова Е.Б., Терехова С.Ф., Греченко Т.Н., Соколов Е.Н. *Биофизика*, 1986, т. 31, № 5, с. 921.
45. Лелекова Т.В., Романовский П.Я., Александров П.Н., Ашмарин И.П. *Бюл. экспер. биологии и медицины*, 1989, т. 108, № 7, с. 8—10.
46. Lelekova T.V., Sanzhieva L.Ts., Ashmarin I.P. *Biomed. Sci.*, 1990, v. 1, № 1, p. 99.
47. Lelekova T.V. *Reports of 2nd International Congress on Ultra Low Doses*. Bordeaux, 1-2 Oct., 1993, p. 35.
48. Bogdanova N.G., Palmina N.P. *Reports of Congress «Magnetic resonance in chemistry and biology»*, Suzdal's, 1998, P-51a, p. 152.
49. Hasegawa J., Hirai S., Kotake H. e. a. *Endocrinology*, 1988, v. 123, p. 2805—2811.
50. Kaissling K.-E. In: *Handbook of sensory Physiology*. 1971, Bd. IV, P. I, Berlin. S. 351—431.

УДК 577.15/.17 + 541.12.035.4

Общие закономерности и возможные механизмы действия биологически активных веществ в сверхмалых дозах

С. В. Зайцев, А. М. Ефанов, Л. А. Сазанов

СЕРГЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ ЗАЙЦЕВ — доктор химических наук, профессор Института физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ и сотрудник департамента молекулярной медицины Каролинского медицинского университета. Область научных интересов: рецепторно-ферментные системы, механизмы регуляции клеточной активности.

Стокгольм, 171 77, Швеция (Department of Molecular Medicine, Karolinska Institutet, 17177 Stockholm, Sweden). E-mail Sergei.Zaitsev@enk.ks.se и Sergei@Zaitsev.genebee.msu.su

АЛЕКСАНДР МИХАЙЛОВИЧ ЕФАНОВ — кандидат химических наук, научный сотрудник Института физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ и сотрудник департамента молекулярной медицины Каролинского медицинского университета. Область научных интересов: механизмы регуляции клеточной активности.

ЛЕОНИД АЛЕКСЕЕВИЧ САЗАНОВ — кандидат физико-математических наук, сотрудник лаборатории молекулярной биологии MRC (MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills road, Cambridge CB2 2QH, U.K.). Область научных интересов: структура и функция мембранных белков.

Парадоксальные эффекты воздействия сверхмалых доз (СМД, 10^{-18} — 10^{-14} М) биологически активных соединений привлекают значительный интерес исследователей в области биохимии, физиологии, фармакологии. Биоэффекты под действием СМД наблюдаются среди самых разных групп веществ — гормонов и регуляторных пептидов (в том числе опиоидных), некоторых веществ непептидной природы. Неожидан-

ным в данном случае оказался как сам факт проявления эффектов СМД (действующие концентрации на 4—6 порядков ниже минимальных наблюдаемых констант диссоциации лиганд-рецепторных комплексов $K_D = 10^{-10}$ — 10^{-11} М [1—4] и потому не должны были бы давать отклик), также необычны закономерности, характерные для действия СМД (полимодальная дозовая зависимость и др.).