

УДК 577.15/.17 + 577.391:577.3 + 577.1

### Особенности действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов низкой интенсивности

Е. Б. Бурлакова

*ЕЛЕНА БОРИСОВНА БУРЛАКОВА — доктор биологических наук, профессор, лауреат Государственной премии, заместитель директора Института биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН (ИБХФ РАН), заведующая лабораторией. Область научных интересов: физико-химические основы регуляторных процессов клетки, биохимические и биофизические механизмы действия на биообъекты биологически активных веществ в сверхмалых дозах и физических факторов низкой интенсивности.*

117334 Москва, ул. Косыгина 4, ИБХФ РАН, тел. (095) 137-64-20, факс (095) 137-41-01,  
E-mail seren@sky.chph.ras.ru

В 1983 г. сотрудники нашего института вместе с коллегами из Института психологии, изучая влияние антиоксидантов на электрическую активность изолированного нейрона виноградной улитки, получили весьма неожиданный результат. Первоначальная доза препарата ( $10^{-3}$  М) была не только активной для нейрона, но и довольно токсичной, поэтому пришлось перейти на менее концентрированный раствор. К нашему удивлению, доза на четыре порядка ниже первоначальной оказалась не только менее токсичной, но и более эффективной. Дальнейшее уменьшение концентрации привело к росту эффекта, он достигал максимума (при  $10^{-15}$  М), затем снижался до уровня (при  $10^{-17}$  М), практически совпадающего с контрольными результатами [1]. Аналогичные закономерности впоследствии были зарегистрированы в экспериментах на животных при введении им холиномиметика ареколина [2].

Мы исследовали обнаруженный эффект при использовании широкого спектра воздействующих факторов: противоопухолевых и антималярийных агентов, радиозащитных препаратов, ингибиторов и стимуляторов роста растений, нейротропных препаратов разных классов, гормонов, адаптогенов, иммуномодуляторов, детоксикантов, антиоксидантов, а также физических факторов — ионизирующего излучения и др. [3]. Уровень биологической организации, на котором изучалось действие сверхмалых доз (СМД) биологически активных веществ, также весьма разнообразен — от макромолекул, клеток, органов и тканей до животных, растительных организмов и даже популяций. Сказанное не означает, что эффект наблюдался при сверхмалых дозах любого биологически активного вещества на любом биологическом объекте. Мы лишь хотим подчеркнуть, что получение эффекта при действии вещества в концентрациях  $10^{-13}$ — $10^{-17}$  М и ниже нельзя связать с какой-то определенной структурой вещества или степенью биологической организации.

Результаты проведенных исследований привели нас к мысли о том, что мы имеем дело не с особенностью действия одного какого-то препарата или ответа одного какого-то биологического объекта, а с некими принципиально новыми закономерностями взаимо-

действия биологических объектов со сверхмалыми дозами биологически активных веществ. Каждому из этих веществ может соответствовать специфическая мишень, свой механизм усиления, присущие только ему особенности метаболизма, однако при сверхнизких дозах вещества демонстрируют и ряд общих закономерностей [3]. В последние годы все больше ученых обращается к проблеме эффекта СМД, расширился спектр биообъектов, на которых проводятся эти исследования, возросло число химических веществ и физических факторов, для которых обнаружена активность в сверхмалых дозах.

Остановимся прежде всего на дефиниции понятия «сверхмалые дозы». При всех имеющихся количественных различиях в существующих определениях границы, разделяющей сверхмалые дозы от обычно применяемых, общая точка зрения состоит в том, что сверхмалыми дозами биологически активных веществ следует считать дозы, эффективность которых не может быть объяснена с общепринятых в настоящее время позиций и требует разработки новых механизмов.

В данном выпуске журнала приведены некоторые из подходов к определению сверхмалых доз биологически активных веществ, вводимых в организм. Так, Ф.С. Духович и соавт. на основании данных о количестве клеточных рецепторов и средства лигандов к ним принимают за абсолютную границу концентрацию  $10^{-11}$  М. Для препаратов с низким сродством к рецепторам сверхмалыми концентрациями (сверхмалыми дозами) можно считать и более высокие значения, в частности  $10^{-9}$ — $10^{-10}$  М. При таком подходе, даже в случае гипотетически более высокого, чем  $10^{12}$  М сродства лигандов к рецепторам, эта граница не может быть ниже  $10^{-11}$  М.

Ряд авторов (в том числе и мы) считают, что граница определяется числом молекул биологически активного вещества на клетку. При введении вещества в организм в дозах  $10^{-12}$ — $10^{-13}$  М в клетке будет содержаться хотя бы 1—10 молекул этого вещества. Поэтому мы относим к СМД концентрации  $10^{-12}$  М и ниже. К близким выводам приходят исследователи, которые при

определении границы для СМД исходят из максимального сродства лигандов к рецептору и потому считают сверхмалыми дозами (концентрациями) биологически активных веществ значения  $10^{-13}$  М и ниже.

Что касается сверхмалых доз физических факторов, то здесь пока не найдено общего определения и в каждом конкретном случае, касающемся того или иного физического агента, следует давать свои дефиниции. Так, например, Научный комитет по атомной энергии при ООН рекомендует называть малыми дозами ионизирующего излучения дозы менее 250 мГр (25 рентген), а малыми мощностями доз — 1,5 мГр/мин и ниже. Однако такого рода определения не могут эффективно использоваться в случае радиостойчивых организмов (бактерии, простейшие эукариоты) и растительных клеток. Поэтому в радиобиологической литературе часто встречается определение малых доз радиации как доз, начиная с которых происходит изменение знака эффекта, например, переход от ингибирования клеточного роста к стимулированию [4].

#### **Феноменологические особенности действия биологически активных веществ в СМД**

Из результатов наших собственных исследований и из литературных данных можно сделать вывод, что в проявлениях влияния на клеточный метаболизм сверхмалые дозы биологически активных веществ и физические факторы низкой интенсивности обнаруживают много общих особенностей, которые касаются как формальных признаков (дозовые зависимости), так и показателей биологической активности.

Природа этого феномена может быть связана с общностью критических мишеней, например, клеточных и субклеточных мембран, а также с особенностями кинетики реакций, в которых важную роль играют слабые взаимодействия. К числу характерных для эффектов СМД свойств следует отнести:

— немонотонную, нелинейную полимодальную зависимость «доза—эффект». В большинстве случаев максимумы активности наблюдаются в определенных интервалах доз, разделенных между собой так называемой «мертвой зоной»;

— изменение чувствительности (как правило увеличение) биообъекта к действию разнообразных агентов в СМД, как эндогенных, так и экзогенных (последние могут быть как той же, что в случае воздействия СМД, так и иной природы);

— проявление кинетических парадоксов, а именно возможность уловить эффект СМД биологически активных веществ, когда в клетке или в организме имеется то же вещество в дозах на несколько порядков выше. Влияние на рецептор вещества в дозах на порядки более низких, чем константы диссоциации комплекса лиганд—рецептор;

— зависимость «знака» эффекта от начальных характеристик объекта;

— «расслоение» свойств биологически активного вещества по мере уменьшения его концентрации, при котором еще сохраняется активность, но исчезают побочные эффекты;

— для физических факторов усиление эффекта с понижением его интенсивности в определенных пределах мощности и доз.

Общие закономерности влияния сверхмалых доз препаратов наиболее ярко проявляются при изучении

дозовых зависимостей. В некоторых случаях эта зависимость бимодальная: эффект возрастает при сверхмалых дозах препаратов, затем по мере увеличения дозы уменьшается, сменяется «мертвой зоной» и вновь усиливается (см. рисунок в ст. Ф.С.Духовича с соавт.). Иногда в дозовой зависимости обнаруживается стадия «перемены знака» эффекта. Например, если в области сверхнизких доз отмечалась ингибирующая активность, то по мере роста концентрации она сменялась на стимулирующую, а затем вновь проявлялся ингибирующий эффект. Известны случаи, когда эффект в очень большом интервале концентраций не зависит от дозы. Так, в одной из ранних работ, где мы исследовали действие гербицида из класса гидропероксидов на растительную культуру клеток, было обнаружено, что препарат проявляет одинаковую активность при дозах, различающихся на шесть порядков ( $10^{-13}$  и  $10^{-7}$  М), а в интервале промежуточных концентраций эффект отсутствует [5].

Такого рода зависимости наблюдались для многих самых разнообразных биологически активных веществ [3, 6—8]. Добавим, что такие зависимости получены и для антималярийных препаратов эфазола и лонидамина [9], для пирасетама [10], при изучении влияния на вязкостные свойства мембран тиролиберина [11], фенозана [12], форболового эфира [13].

Сложные дозовые зависимости с наличием «мертвых зон», по-видимому, явились причиной того, что активность сверхмалых доз препаратов не была открыта ранее, поскольку результаты, получаемые в пределах доз до начала «мертвой зоны», не побуждали исследователей уменьшать дозу еще далее и не давали повода ожидать появления эффектов СМД.

Следующая особенность — изменение чувствительности к действию разнообразных факторов после введения вещества в СМД — также представляется универсальной. На этом основано получение, например, таких эффектов, как достижение синергизма при действии двух противоопухолевых агентов, один из которых вводился в СМД [14, 15], и повышение активности выше аддитивной для гербицидных препаратов, когда один из них применялся в СМД [3, 16].

Информация, касающаяся кинетических парадоксов, и предлагаемые объяснения даются в статьях И.П. Ашмарина с соавт. и С.В. Зайцева с соавт., публикуемых в данном номере журнала.

Относительно другого свойства — знака эффекта, известно, что его направленность зависит от начальных характеристик биообъекта. Например, было обнаружено, что антиоксидант в СМД действовал направленно на изолированные нейроны с разными потенциалами действия, при этом если потенциал был высоким, антиоксидант его уменьшал, если низким — увеличивал [3]. Наблюдали аналогичное действие электромагнитного излучения на кальциевый рецептор [17], антиоксиданта на окислительную активность эритроцитарных мембран с разным начальным ее уровнем [3], ионизирующего излучения на активность ферментов [18, 19].

«Расслоение» свойств, исключение побочных эффектов по мере уменьшения концентрации биологически активного вещества хорошо демонстрируют результаты изучения действия феназепам в широком интервале концентраций (см. статью Т.А. Ворониной и Г.М. Молодавкина в этом номере журнала). В высоких дозах феназепам проявляет свойства снотворного, поэтому он разрешен к использованию в качестве ноч-

ного транквилизатора. В сверхмалых дозах он сохраняет транквилизирующую активность, но полностью лишен седативного и миорелаксантажного действия [20—22]. Это позволило авторам получить патент на использование феназепам в СМД в качестве дневного транквилизатора.

### Особенности биологического действия малых доз ионизирующего излучения

Основные закономерности действия физических факторов низкой интенсивности рассмотрим на примере ионизирующего излучения. Исследованиями последних лет однозначно доказано, что облучение в малых дозах вызывает многочисленные структурные перестройки в клетках, сохраняющиеся длительное время после облучения и приводящие к изменению функциональной активности клеток.

Нами был проведен широкий комплекс биохимических и биофизических исследований клеток органов животных (мышей), подвергнутых  $\gamma$ -облучению ( $^{137}\text{Cs}$ ) низкой интенсивности. Были изучены скорость щелочной элюции ДНК лимфоцитов и печени, нейтральной элюции и адсорбции на нитроцеллюлозных фильтрах ДНК селезенки, структурные характеристики (ЭПР-метод спиновых зондов) ядерных, митохондриальных, синаптических, эритроцитарных и лейкоцитарных мембран.

В рамках исследований функциональной активности клетки изучались активность и изоформы ферментов альдолазы и лактатдегидрогеназы, активность ацетилхолинэстеразы, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, скорость образования супероксидных анион-радикалов, состав и антиокислительная активность липидов перечисленных выше мембран, а также чувствительность клеток, мембран, ДНК, организма к действию дополнительных повреждающих факторов [23—26].

Для всех изученных параметров была обнаружена бимодальная зависимость их от дозы, а именно, эффект нарастал при низких дозах, достигая максимума (низкодозового), затем снижался (в некоторых случаях знак эффекта менялся на противоположный) и далее с увеличением дозы вновь нарастал. В качестве примера на рис. 1 приведены дозовые зависимости для адсорбции ДНК селезенки и микровязкости липидов ядерных мембран, характеризующейся временем враща-

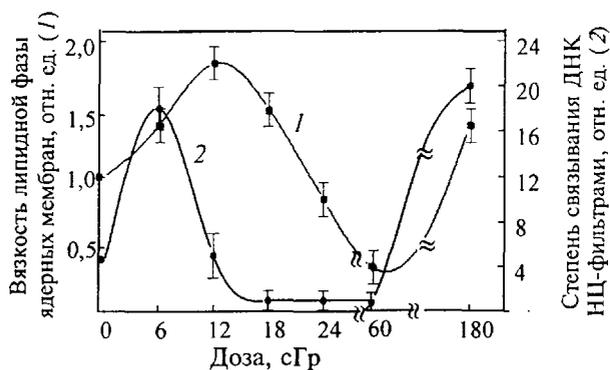


Рис. 1. Зависимость степени связывания ДНК с нитроцеллюлозными (НЦ) фильтрами и микровязкости липидов ядерных мембран печени облученных мышей от дозы облучения с интенсивностью 6 сГр/сут.

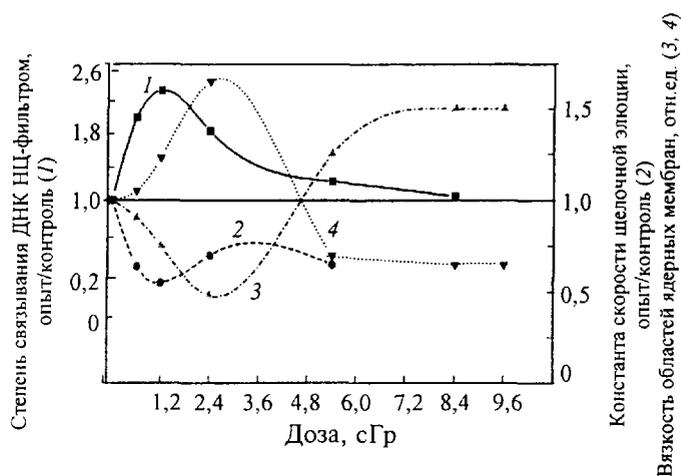


Рис. 2. Дозовые зависимости изменения структурных параметров генома и ядерных мембран органов мышей, облученных в интервале доз 0,6—9,6 сГр при интенсивности 0,6 сГр/сут.

тельной корреляции спинового зонда ( $\tau_1$ ). Как и структурные характеристики ДНК, микровязкость липидов мембран изменяется экстремально с дозой излучения, причем экстремальные значения получены при дозе 12 сГр. Отметим, что представленные на рис. 1 изменения, полученные при дозе 6 сГр, сопоставимы с изменением структурных характеристик макромолекул при дозах в 20—30 раз более высоких.

Величина низкодозового максимума эффекта и доза, при которой он достигается, зависят от природы биообъекта и мощности дозы. На рис. 2 приведен пример структурных изменений генома и ядерных мембран при  $\gamma$ -облучении с меньшей интенсивностью (0,6 сГр/сут.).

Общей закономерностью дозовых зависимостей для изученных нами показателей является смещение максимума в область более низких доз при уменьшении интенсивности излучения. Как видно из рис. 2, при интенсивности излучения 0,6 сГр/сут. изменение адсорбции на нитроцеллюлозных фильтрах ДНК селезенки мышей в зависимости от дозы излучения проходит через максимум при 1,2 сГр, а при дозе 5,4 сГр величина адсорбции практически не отличается от контроля (кривая 1). Аналогичная, но антибатная экстремальная зависимость с минимумом при 1,2 сГр получена для константы скорости щелочной элюции ДНК лимфоцитов крови мышей (кривая 2).

Изменения структурных характеристик ядерных мембран, представленные на кривых 3, 4, проходят через экстремум при дозе 2,4 сГр, причем микровязкость различных областей мембран изменяются антибатно относительно друг друга. В отличие от структурных характеристик ДНК (адсорбция) микровязкость обеих фаз мембран значительно отличается от контроля в интервале доз 6—9,6 сГр. Обращает на себя внимание сравнимый масштаб синхронных структурных сдвигов, происходящих в ДНК и мембранах под влиянием столь малых доз излучения низкой интенсивности.

Для оценки функциональной активности клеток мы воспользовались данными о кинетических параметрах мембранных и цитозольных ферментов в клетках облученных животных. Изменения этих парамет-

ров наблюдались уже при дозах излучения 1,2–2,4 сГр. При этом было отмечено длительное сохранение измененных кинетических свойств ферментов после облучения в дозе 1,2 сГр, а также нарушение регуляторных функций ферментов как за счет изменения соотношения изоформ лактатдегидрогеназы и альдолазы, так и при изменении соотношения между активностью фермента и его субстратом — для супероксиддисмутазы. Таким образом, после низкоинтенсивного облучения нелинейно (в зависимости от дозы) меняется и функциональная активность клеток.

Важным результатом исследований было установление изменения чувствительности отдельных макромолекул, клеток и организма к дополнительным воздействиям повреждающих факторов как той же, так и иной природы. Обнаружено, что после облучения в низких дозах увеличивается степень гемолиза эритроцитов опытных животных (мышей), меняется чувствительность центральной нервной системы к нейромедиаторам, к агонистам и антагонистам, изменяется ответная реакция клеток на регуляторные воздействия, на повторное облучение, на введение радиосенсибилизаторов и протекторов [27, 28].

Предлагаемое нами объяснение природы нелинейной бимодальной зависимости эффекта от дозы основывается на представлениях о том, что существует разрыв между дозами, вызывающими повреждения в биообъектах и иницирующими системы их восстановления. В связи с этим пока системы восстановления (или адаптации) не работают с полной интенсивностью, биоэффект нарастает с увеличением дозы, затем по мере усиления процессов восстановления или сохраняется на том же уровне, или уменьшается вплоть до элиминирования, или может сменить свой знак и вновь нарастает с увеличением дозы, когда повреждения в биообъектах превалируют над восстановлением.

Другим весьма важным результатом является установление связи эффектов низкоинтенсивного облучения с мощностью дозы радиации. Было обнаружено, что с уменьшением мощности облучения увеличивается «радиационно-химический» выход, при этом дозы, при которых достигаются равные эффекты, снижаются.

Все эти данные говорят о том, что реакция организма на действие малых доз излучения есть функция дозы, мощности облучения и времени, прошедшего с начала облучения.

Таким образом, для воздействия физических факторов, а именно низкоинтенсивного ионизирующего излучения характерны те же закономерности, что и в случае СМД биологически активных веществ: нелинейная, немонотонная, бимодальная зависимость эффекта от дозы, наличие «мертвой зоны», изменение чувствительности к действию эндогенных и экзогенных факторов, обратная зависимость от интенсивности облучения.

Близкие закономерности получены и для неионизирующего излучения [29–31].

#### **Сверхмалые дозы биологически активных веществ и их влияние на активность ферментов**

Как уже было отмечено выше, аномальная дозовая зависимость эффекта в области сверхнизких концентраций биологически активных веществ зарегистрирована на уровне ответа не только клетки или целостного организма, но и отдельных биомолекул.

Рассмотрим более подробно влияние СМД на активность ферментов. Соответствующие экспериментальные исследования проводились как с изолированными ферментами, так и на клеточном и организменном уровнях с последующим определением активности фермента. В опытах на изолированном ферменте протеинкиназе С, выделенной из сердца животного, изучали ингибирующее действие токоферола. Напомним, что протеинкиназа С — сложный, липидзависимый кальций-требующий фермент, который имеет несколько активных центров, аллостерически взаимодействующих друг с другом. По литературным данным токоферол оказывает ингибирующее действие на активность протеинкиназы С в области концентраций  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  М [32]. Наши исследования в широком интервале концентраций ( $10^{-18}$ – $10^{-5}$  М) показали, что существует бимодальная зависимость эффекта от дозы: токоферол активно ингибирует протеинкиназу С при концентрациях  $10^{-16}$ – $10^{-12}$  М и  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  М, в промежуточном интервале концентраций активность его существенно ниже.

Аналогичные данные получены и для протеинкиназы С, предварительно активированной форболовым эфиром. Ингибирующая активность такого фермента при низких концентрациях токоферола меньше, чем у неактивного, и максимум ее приходится на более высокие концентрации токоферола, но бимодальный характер зависимости сохраняется [33].

Важно отметить, что при практически равном ингибировании протеинкиназы С в СМД и обычных дозах кинетические параметры этого фермента, в частности константа Михаэлиса и степень кооперативности фермента в отношении субстрата изменяются по-разному. При концентрации токоферола  $10^{-14}$  М сродство фермента к субстрату не меняется, в то время как при дозе  $10^{-4}$  М сродство уменьшается вдвое. Обратная зависимость наблюдается для коэффициента Хилла, который определяет кинетическую кооперативность. Степень кооперативности при действии СМД токоферола вдвое выше, чем в контроле и в опыте с  $10^{-4}$  М токоферола. В определенной степени это может быть связано с изменением структуры фермента.

В этом исследовании выявлена также однонаправленность эффекта влияния токоферола в сверхмалой и обычной дозах: и в том, и в другом случае наблюдается ингибирование.

Более подробно результаты этих исследований изложены в статье Н.П. Пальминой с соавт. в данном номере журнала.

Изучалось также влияние на активность протеинкиназы С другого антиоксиданта — фенозана [34].

В ранее проведенных опытах было установлено, что как по отношению к изолированному ферменту [35], так и на клеточном уровне фенозан проявляет ярко выраженные свойства активатора фермента. Ни при одной из изученных концентраций не обнаруживался обратный эффект — ингибирование активности. Так же, как и для токоферола, максимальное действие фенозана проявляется в двух концентрационных интервалах  $10^{-8}$ – $10^{-4}$  М и  $10^{-16}$ – $10^{-18}$  М для нормальных клеток и  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  М для опухолевых. В интервале между этими концентрационными интервалами эффект практически отсутствует.

Соотношение между количеством молекул фенозана (для интервала  $10^{-16}$ – $10^{-18}$  М) и количеством клеток, на которые он воздействует, равно от 3 до 300

молекул фенозана на одну клетку, а по отношению к числу молекул протеинкиназы С — от 1 до 100 молекул фенозана на  $10^7$  молекул протеинкиназы.

Более подробные сведения об этих исследованиях приведены также в статье Н.П. Пальминой с соавт.

В работах Е. М. Молочкиной и сотруд. изучалась активность ацетилхолинэстеразы при действии антиоксиданта — фенозана в СМД [36, 37, см. также статью Е.М. Молочкиной с соавт. в этом номере журнала]. Особая ценность этого цикла работ заключается в том, что исследования проводились параллельно в условиях *in vitro* на уровне изолированного фермента и фермента в составе синапсом, выделенных из головного мозга животных, которым внутрибрюшинно вводился фенозан.

При действии фенозана на растворимый фермент и мембраносвязанный фермент *in vivo* наблюдается уменьшение эффективности фермента (а соответственно его активности при «реальных» физиологических концентрациях ацетилхолина), в основном, за счет увеличения константы Михаэлиса  $K_M$ . Дозовая зависимость изменений кинетических параметров обнаруживает два максимума, отвечающих концентрациям, которые различаются на шесть порядков.

Величины эффектов обычных и сверхмалых (отличающихся на 6—8 порядков) доз фенозана соизмеримы.

Аналогичный комплекс исследований с введением ацетилхолина (внутрибрюшинно мышам) показал активацию ацетилхолинэстеразы за счет уменьшения константы  $K_M$  и увеличения максимальной скорости гидролиза ацетилхолина. Эффект для  $K_M$  одинаков в области малых и высоких доз [38].

При действии ацетилхолина как эффектора на растворимый фермент наблюдали стадийные изменения кинетических параметров ацетилхолинэстеразы, при этом эффективность фермента не претерпевала достоверных изменений. В случае мембраносвязанного фермента достоверные изменения кинетических параметров наблюдали только при концентрации  $10^{-13}$  М ацетилхолина.

Всесторонние исследования влияния фенозана и ацетилхолина (экзогенного) описаны в статье Е.М. Молочкиной с соавт.

В опытах М.Г. Сергеевой и др. [39] по изучению действия бруфена (анальгетик ибупрофен) на активность фермента простагландинсинтазы было обнаружено увеличение скорости образования продуктов с участием этого фермента при концентрациях бруфена  $10^{-11}$ — $10^{-14}$  М, в то время как в концентрациях  $10^{-6}$  М этот препарат являлся ингибитором. Однако эффективность бруфена в СМД проявлялась только в том случае, если он действовал на клетки. В то же время на изолированный фермент бруфен в СМД не оказывал влияния. Это дало авторам основание утверждать, что малые дозы бруфена ускоряют выход простагландинсинтазы из клетки в реакционную среду. Отношение количества бруфена к числу клеток составляло 6 : 1.

Как и в опытах с протеинкиназой С и ацетилхолинэстеразой, активность простагландинсинтазы зависела экстремально от дозы бруфена (максимум наблюдался при концентрации  $10^{-12}$  М) и также обнаруживалась «мертвая зона» ( $10^{-9}$ — $10^{-6}$  М) при переходе от стимулирующего к ингибирующему эффекту.

В работах Хариша и Диттмана [40] исследовалось влияние различных лигандов на активность ферментов

*in vivo* и *in vitro* на клеточных культурах и в бесклеточной среде. Во всех модификациях была зафиксирована нелинейная немонотонная зависимость эффекта от дозы. Эффекты СМД были обнаружены по отношению к широкому спектру ферментов. Это уратоксидаза, кислая фосфатаза, цитохром-Р-450-редуктаза, ксантинооксидаза, дегидрогеназа, глутатион-S-трансфераза. К сожалению, количественные данные о соотношениях между числом молекул фермента и лиганда в статье не приводятся.

При изучении влияния антиоксиданта фенозана на активность регуляторных ферментов — альдолазы и лактатдегидрогеназы обнаружены те же бимодальные зависимости от дозы [12]. Показано, что изменение активности фермента происходит параллельно с изменением вязкостных свойств мембранных липидов.

Как следует из результатов исследований активности протеинкиназы С и ацетилхолинэстеразы, антиоксиданты действуют однотипно и в «обычных» концентрациях ( $10^{-3}$ — $10^{-5}$  М), и в сверхмалых ( $10^{-9}$ — $10^{-18}$  М). Если токоферол выступает как ингибитор протеинкиназы в концентрации  $10^{-4}$  М, то он ингибирует активность этого фермента и в дозе  $10^{-15}$ — $10^{-17}$  М, если фенозан — активатор протеинкиназы С в дозе  $10^{-5}$ — $10^{-6}$  М, то он активатор и в дозе  $10^{-18}$  М, если фенозан — ингибитор ацетилхолинэстеразы в дозе  $10^{-4}$ — $10^{-5}$  М, то он ингибитор фермента и в дозе  $10^{-13}$ — $10^{-14}$  М.

Из этого можно было бы заключить об общности механизмов действия лигандов на активность ферментов в обычных дозах и в СМД. Однако полученные результаты не могут быть объяснены с позиции классической биохимии. Соотношение лиганд—фермент, равное в среднем одна молекула лиганда на  $10^4$ — $10^9$  молекул фермента, исключает объяснение природы эффекта СМД за счет образования комплекса лиганд—фермент. Биохимические механизмы усиления ответной реакции, например, через системы регуляции циклическим нуклеотидом, через фосфоинозитидный цикл, применимые к эффектам на клеточном уровне, не могут быть использованы для объяснения эффектов в модельных системах.

Возникает естественная мысль, что биологически активные вещества в концентрациях  $10^{-11}$ — $10^{-18}$  М могут реализовывать иные механизмы воздействия на активность ферментов.

#### **О механизме действия сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов**

Чтобы понять, как влияют сверхмалые дозы препаратов на биологические объекты, нужно в первую очередь объяснить с кинетической точки зрения саму возможность реакций столь малого количества молекул со своими мишенями. При концентрациях  $10^{-15}$  М и ниже перестает работать закон действующих масс Вант-Гоффа и в определенной степени теряется понятие «концентрация».

В работе Л.А. Блюменфельда, А.Ю. Гросберга и А.Н. Тихонова используется уравнение Смолуховского, описывающее реакцию между молекулами и малыми, но макроскопически замкнутыми везикулами с позиции статистической физики [41]. Показано, что закон действующих масс нарушается, когда объем везикул и (или) константа равновесия реакции относительно малы, а среднее число свободных частиц

внутри везикулы составляет порядка единицы или меньше. Важное значение приобретают флуктуации в случае биологических везикул размером  $10^2$ — $10^3$  Å.

Л.А. Блюменфельд высказал идею о параметрическом резонансе как о возможном механизме действия сверхнизких концентраций биологически активных веществ на клеточном и субклеточном уровнях [42]. Он полагает, что параметрический резонанс возникает при совпадении временных параметров запускаемых биологически активными веществами внутриклеточных процессов и характерного времени подхода вещества к мишени. В результате связывания активного вещества с его мишенью фермент (рецептор) переходит в конформационно неравновесное состояние, которое на определенной стадии релаксации обеспечивает его максимальную активность.

При очень больших концентрациях биологически активного вещества, когда характерное время подхода к мишени мало, а частота подхода велика, весь фермент будет находиться в малоактивном конечном неравновесном состоянии. При очень малой концентрации, когда характерное время подхода вещества к мишени очень велико, почти весь фермент (рецептор) остается в малоактивном исходном равновесном состоянии. И только для доз, при которых характерное время подхода активного вещества к своей мишени и временные параметры запускаемых им внутриклеточных процессов практически совпадают, можно ожидать промежуточной активной неравновесной конформации в максимальной стационарной концентрации.

Расчеты показывают, что пик активности фермента приходится на дозы вещества  $10^{-11}$ — $10^{-15}$  М.

Для более высоких или низких концентраций активность будет существенно ниже. Равная или более высокая активность достигается лишь при увеличении концентрации до  $10^{-5}$ — $10^{-4}$  М, когда действует уже другой механизм вследствие насыщения центров ферментов (рецепторов) лигандами. С точки зрения этих представлений биологически активное вещество может взаимодействовать со своими мишенями, даже если константа диссоциации его комплекса с мишенью будет существенно выше (на порядки), чем применяемые концентрации. В рамках этих представлений находит свое объяснение и наблюдаемое уменьшение активности фермента при возрастании дозы действующего вещества.

Мы предложили другой подход к объяснению кинетических парадоксов [43]. В основу его положены представления об аллостерическом взаимодействии каталитических центров в молекуле фермента.

Допустим, что фермент или рецептор содержит несколько центров с разным сродством к субстрату, например, константа диссоциации для одного центра равна  $10^{-13}$  М, а для другого —  $10^{-8}$  М. Когда вводятся низкие дозы препарата, его молекулы преимущественно связываются с высокоактивным центром фермента. При увеличении дозы в «игру» вступает второй ферментный центр. Он взаимодействует аллостерически с первым центром, понижая его сродство к субстрату, и тогда все молекулы, которые были связаны с первым центром, «сходят» с него. Снова с ним связаться они могут только после того, как концентрация препарата приблизится к значению константы диссоциации комплекса лиганда с первым центром, достигнутой под воздействием второго центра. Такое представление используется, в частности, для объяснения

ответа обонятельного рецептора на изменение дозы субстрата.

В статьях этого номера журнала приведен ряд гипотез, трактующих механизм усиления биологического сигнала на воздействие сверхмалых доз как синтез «размножения» веществ, ведущих цепь передачи сигнала от СМД к биомишеням. На наш взгляд, основную трудность в построении этих гипотез представляет объяснение первичного акта взаимодействия единичных молекул с биомишенями. В наших исследованиях мы обнаружили, что всякий раз при введении сверхмалых доз биологически активного вещества в организм животного, клеточную культуру или в модельную систему, содержащую суспензию мембран, отмечается изменение структурных характеристик мембран. В свою очередь изменения структуры мембран могут приводить к изменению функционального состояния клетки, а наличие полимодальности в ответе можно объяснить сменой механизма действия вещества в том или ином концентрационном интервале на структуру мембраны. Но как объяснить первичный акт взаимодействия биологически активного вещества в СМД с белком или липидом мембраны, если отношение числа молекул этого вещества к числу молекул белка равно  $1 : 10^6$ — $10^9$ ?

В толковании механизмов действия сверхмалых доз существует два альтернативных подхода. Одни исследователи считают, что наличие общих закономерностей в зависимости «доза—эффект», изменение чувствительности биологических объектов к широкому спектру разнообразных факторов (внутренних и внешних), гетерогенность ответа как результат введения сверхмалых доз — все это свидетельствует лишь о внешнем сходстве явлений. В каждом конкретном случае рекомендуется искать свой механизм, свои мишени действия, свои возможности усиления сигнала и т.д. Другие исследователи, не отрицая специфичности реакции в каждом конкретном случае, развивают представления об общем характере формирования ответа биологических объектов на сверхмалые дозы, о системном изменении метаболизма под влиянием сигналов из внешней среды.

Мы придерживаемся второй точки зрения, а это означает, что мы пытаемся найти механизмы, позволяющие объяснить с единых позиций эффекты не только на уровне клетки и организма, но и на уровне взаимодействия СМД биологически активных веществ с выделенными биополимерами. При этом в первую очередь возникает желание объяснить наблюдаемые закономерности с точки зрения представления о влиянии сверхмалых доз физических факторов и химических веществ на структурные характеристики воды.

Многочисленные (главным образом, теоретические) исследования роли структуры воды в ее биологической активности можно разделить на две группы. Одни исследователи придерживаются точки зрения, что долгоживущие кластеры имеются в самой воде, другие считают, что водные кластеры индуцируются вводимыми биологически активными веществами. В свете этих двух точек зрения ниже дан краткий обзор представлений о структурных образованиях воды и о роли их в эффектах в биологических системах.

В работах С.И. Аксенова и соавт. указывается сложный характер воздействия воды на структуру биополимеров и биомембран, где важное значение имеет множество факторов: гидратация полярных групп, конкуренция молекул воды за водородные свя-

зи в этих структурах, гидрофобное взаимодействие, различие диэлектрической проницаемости свободной и связанной воды и др. Анализ экспериментальных данных позволил авторам выделить четыре стадии гидратации, которые вызывают соответствующие изменения в структуре, динамике и функции фотосинтетических мембран. Подобные процессы очень чувствительны к различным воздействиям, даже в СМД. С точки зрения авторов, СМД не индуцируют новые стабильные структуры в воде, а лишь влияют на процессы взаимодействия воды с биополимерами и таким образом изменяют их функциональную активность. Близкие взгляды разделяет Арад с сотр. [45].

В работах Н.А. Бульenkова [46, 47] на основании модульного обобщения кристаллографических данных составлены все возможные типы алгоритмов формирования иерархических системообразующих структур связанной воды, совпадающие с морфологическими паттернами, наиболее часто встречающимися в живой природе. Представления об иерархических модульных структурах связанной воды отражают потенциальную возможность образования на их основе пространственных структур биополимеров и биосистем. Вместо общепринятой модели непосредственного взаимодействия лигандов с биомишенями автор предлагает модель их взаимодействия по направленным водородным связям с системообразующим каркасом из спиралей связанной воды. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ также опосредуется через их воздействие на каркас из спиралей связанной воды.

Согласно мнению С.В. Зенина, В.И. Лобышева и др. [48—50], долгоживущие структурные образования уже существуют в чистой воде.

Определенные выводы о структуре воды и ее растворов были получены на основании изучения люминесценции воды [50]. Спектр возбуждения дистиллированной воды имеет два максимума, 280 и 310 нм, спектр излучения характеризуется максимумами при 360 и 410 нм. Интенсивность люминесценции зависит от времени хранения воды, а также от наличия примесей, обладающих или не обладающих собственной люминесценцией.

Судя по спектрам люминесценции, структура воды в разбавленных растворах длительное время после их приготовления претерпевает изменения и только через несколько суток приходит к равновесию. Характер динамики переходных процессов релаксации может быть как монотонным, так и колебательным. Интенсивность люминесценции чувствительна к действию слабых полей электромагнитной природы, причем реакция водных растворов на внешнее поле существенно зависит от состояния раствора в момент наложения поля и максимальна, когда система далека от равновесия. По мнению автора [50], структурные образования воды и водных растворов можно рассматривать как первичную мишень для малых концентраций растворенных веществ, а также для воздействия слабых полей. Соответствующее изменение свойств воды приводит к изменению свойств биомембран, а отсюда и к изменению функциональной активности клетки.

Для верификации клатратной модели воды и водных растворов [51] применялись методы диэлектрической и дифференциальной сканирующей калориметрии. Первый метод подтвердил, что высокоразбавленные растворы содержат свободные и связанные в виде клатратов молекулы. Второй метод позволил определить, что фазовые переходы обусловлены разрушени-

ем клатратов при определенной температуре. Эта температура лимитируется специфическими клатратами, которые являются характерными для маточных веществ. Окружая молекулу биологически активного вещества, клатраты «запечатлевают» ее структуру и эти отпечатки живут достаточно долго.

С.В. Зенин [48, 49] исходит из тех предпосылок, что вода представляет собой единую структуру. Расстворение в ней тех или иных веществ приводит к появлению в этой структуре определенных «дефектов», которые способны к длительному существованию и переходам при последующих разбавлениях вплоть до состояния, когда уже отсутствует само вещество.

Арад [45], как и многие другие исследователи, придает основное значение гидратации белковых молекул и нарушению водно-белковых взаимодействий под влиянием тех или иных растворенных веществ. При этом изменение функциональной активности белков связывается не с взаимодействием их с биологически активным веществом, а с изменением степени гидратирования белка, и, следовательно, с изменением его структуры и активности.

Таким образом, существует множество моделей [44—52], авторы которых пытаются объяснить реакцию биообъектов на СМД биологически активных веществ через структурные свойства воды. Однако экспериментальных доказательств этих моделей явно недостаточно и, главное, нет опытных данных, которые свидетельствовали бы о долговременности существования структурных кластеров.

Вместе с тем нельзя не признать, что многие парадоксы СМД, о которых здесь говорилось, весьма логично разрешаются на основе представлений об изменении структуры воды. Например, поддается объяснению тот факт, что знак и направление эффекта зависят в ряде случаев от начальных свойств биообъекта. Если у фермента высокая активность — она снижается, если низкая — повышается. Но самое поразительное, что уровень, до которого она изменяется, один и тот же. Это легко объясняется тем, что в растворе биологически активного вещества структура воды изменяет структуру белка одинаковым образом.

Также перестает быть парадоксом эффект воздействия на биомишень веществ, когда их концентрация на много порядков ниже константы диссоциации лиганд-рецепторного комплекса или концентрации белка.

В заключение отметим, что явно возросший в последнее время интерес к проблеме сверхмалых доз стимулирует исследования структуры воды и влияния на нее различных факторов, и появляются принципиально новые воззрения на механизм действия СМД. Так, ряд авторов полагает, что в процессе растворения, потенцирования вещества или воздействия на растворы биологических веществ электромагнитных полей в воде возникают активные формы кислорода и именно они, а не непосредственное излучение или биологически активное вещество действуют на биообъекты [53].

Вероятно, новые возможности в объяснении эффектов СМД с точки зрения влияния структуры воды откроются при изучении действия веществ, близких по структуре и проявляющих одинаковую активность в дозах  $10^{-5}$ — $10^{-4}$  М, но различающихся тем, что одни из них вызывают эффекты в сверхмалых дозах, а другие — нет [53, 54]. Квантовомеханическое изучение

таких веществ позволит обнаружить различие между ними, но имеет ли это различие определяющее значение для эффектов сверхмалых доз и можно ли его связать с особенностями влияния веществ на структуру воды, еще не ясно.

#### Некоторые примеры практического применения СМД биологически активных веществ

В статьях Т.А. Ворониной и соавт. и И.А. Ямскова и соавт., помещенных в данном выпуске журнала, приводятся сведения о физиологическом действии лекарственных веществ в СМД, которые в настоящее время или уже разрешены для медицинского применения (адгелон), или же находятся на стадии рассмотрения Фармакологическим комитетом России (феназепам в СМД). Преимущества применения подобных лекарственных средств подробно обсуждаются в указанных статьях.

Большое внимание к созданию лекарственных препаратов в СМД проявляют онкологи. Хорошо известно, что основным тормозом в химиотерапии злокачественных новообразований является токсичность противоопухолевых соединений. Поэтому практическая направленность исследований в химиотерапии ориентирована на разработку методов применения противоопухолевых препаратов, обеспечивающих их «избирательное» повреждающее действие на опухоль при отсутствии токсической реакции со стороны нормальных тканей организма.

Определенной экспериментальной предпосылкой для проведения такого рода исследований может служить обнаруженное нами ранее явление индукции хромосомных аберраций в злокачественных клетках сверхмалыми дозами противоопухолевого препарата нитрозометилмочевина [56]. При цитогенетическом исследовании влияния препарата на структуру хромосом клеток опухоли Эрлиха и лейкоза L-1210 было установлено, что нитрозометилмочевина в дозе  $10^{-17}$  моль/кг в сутки вызывает хромосомные аберрации в клетках обоих типов опухолей как при однократном, так и при многократном введении препарата. Доля клеток с перестройками хромосом составляет 15–20%, что сопоставимо с цитогенетическим эффектом данного вещества в терапевтической дозе  $10^{-4}$  моль/кг (25% поврежденных клеток в популяции). Однократное введение нитрозометилмочевины в дозе  $10^{-17}$  моль/кг приводит к увеличению средней продолжительности жизни (на 40%) животных с лейкозом L-1210 [15].

В последующих исследованиях в этом направлении была проведена оценка биологических эффектов противоопухолевых препаратов различного действия — указанной уже нитрозометилмочевины, циклофосфана и адриамицина — в области сверхмалых концентраций, отличающихся на десять и более порядков от общепринятых терапевтических доз. Опухолевой моделью служила карцинома легких Льюис. Критериями оценки биологического эффекта препаратов были изменения продолжительности жизни и размеров опухоли у лечебных животных. Установлено, что сверхмалые дозы всех этих цитостатиков проявляют биологическую эффективность на модели карциномы Льюис, причем направленность эффекта зависит как от природы действующего агента, так и от дозы препарата.

Нитрозометилмочевина обладает способностью как глубоко ингибировать ( $10^{-5}$ – $10^{-10}$  М), так и стимулировать ( $10^{-20}$  М) рост опухоли. Циклофосфан во всех исследовавшихся сверхмалых концентрациях стимулирует рост опухоли. Адриамицин во всех случаях ингибирует развитие опухоли [57].

Таким образом, впервые установлено, что цитостатики, в частности адриамицин, обладают способностью оказывать в сверхмалых дозах ( $10^{-10}$ – $10^{-20}$  М) противоопухолевый эффект, сопоставимый с активностью препаратов в терапевтических дозах ( $10^{-2}$ – $10^{-3}$  М). Результаты экспериментальных исследований явились основанием для разработки протокола пилотных клинических испытаний адриамицина в сверхмалых дозах при лечении больных опухолевыми заболеваниями. Полученные результаты дополняют имеющуюся информацию о реакции живых систем на сверхслабые воздействия и свидетельствуют о целесообразности дальнейшего развития экспериментальных работ в данной области.

Близко к этим работам примыкают исследования антиметастатического действия ряда лекарственных препаратов [9, 58].

Таким образом, уже на сегодняшней стадии изучения эффектов сверхмалых доз биологически активных веществ можно говорить о перспективности внедрения в практику в ближайшем будущем результатов этих исследований. Успехи в изучении механизмов действия СМД будут достигнуты в более поздние сроки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е.Б., Греченко Т.Н., Соколов Е.Н., Терехова С.Ф. Биофизика, 1986, т. 31, № 5, с. 921–923.
2. Бурлакова Е.Б., Хохлов А.П. Биол. мембраны, 1985, т. 2, с. 557–565.
3. Бурлакова Е.Б. Вестн. РАН, 1994, т. 64, вып. 5, с. 425–431.
4. Кузин А.М. Идеи радиационного гормезиса в атомном веке. М.: Наука, 1995, 158 с.
5. Богатыренко Т.Н., Редкозубова Г.П., Конрадов А.А. и др. Биофизика, 1989, т. 34, № 26, с. 327–329.
6. Сазанов Л.А., Зайцев С.В. Биохимия, 1992, т. 57, с. 1443–1460.
7. Ашмарин И. П., Каразеева Е. П., Лелекова Т. В. Тр. 5-ой Международной конференции, С.-П.: Лики России, 1996, с. 29–34.
8. Davis J.M., Svendsgaard D.J.J. Toxic and Env. Health, 1990, v. 30, p. 71–83.
9. Коновалова Н.П., Френки Ф., Дьячковская Р.Ф., Волкова Л.М. Изв. АН. Сер. биол., 1995, № 6, с. 750–753.
10. Тушмалова Н.А., Прагина Л.Л., Иноземцев А.Н., Гумаргалеева К.З., Соловьев А.Г., Бурлакова Е.Б. Бюл. эксперим. биол. и мед., 1995, т. 120, с. 60–61.
11. Гендель Л. Я., Яковлева Н. Е., Лелекова Т. В., Федин В. А., Яковлев Е. И. Изв. АН. Сер. биол., 1997, № 1, с. 103–106.
12. Трещенкова Ю. А., Голощапов А. Н., Бурлакова Е. Б. Тез. Международной конф. «Биоантиоксидант». Москва, 1998, с. 182–183.
13. Пальмина Н.П., Богданова Н.Г., Мальцева Е.Л., Пынзарь Е.И. Биол. мембраны, 1992, т. 9, с. 77–91.
14. Safrin J., Tsuchitani T., Zighuboin J., Bonavida B. In: Ultra-Low Doses. Ed. C. Doutrempuich. Univ. Bordeaux, France, 1991, p. 27–43.

15. Крутова Т.В., Островская Л.А., Рыкова В.А., Корман Д.Б. Изв. АН. Сер. биол., 1994, № 5, с. 738—744.
16. Бурлакова Е. Б., Богатыренко Т. Н., Конрадов А. А. Тез. X Международной конференции «Химия органических и элементоорганических пероксидов». Москва, 1998, с. 130.
17. Фесенко Е.Е., Гелетюк В.И., Казаченко В.Н., Чемерие А.К. Тез. 1-го Международного конгресса «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине». Санкт-Петербург, 1997, с. 52.
18. Трещенкова Ю.А., Бурлакова Е.Б. Радиационная биология, 1997, т. 37, вып. 1, с. 3—12.
19. Вартамян Л.С., Гуревич С.М., Козаченко А.И. и др. Биохимия, 2000 (в печати).
20. Молодавкин Г.М., Бурлакова Е.Б., Чернявская Л.И., Воронина Т.А., Хорсева Н.И., Середенни С.Б. Бюл. эксперим. биол. и мед., 1986, т. 121, № 2, с. 164—166.
21. Воронина Т.А., Молодавкин Г.М., Чернявская Л.И., Середенни С.Б., Бурлакова Е.Б. Там же, 1997, т. 124, № 9, с. 308—310.
22. Патент РФ № 2102986, 1998.
23. Бурлакова Е.Б., Голощапов А.Н., Горбунова Н.В. и др. Радиационная биология, 1996, т. 36, вып. 4, с. 610—631.
24. Смотряева М.А., Крутлякова К.Е., Шишкина Л.Н. и др. Там же, 1996, т. 36, вып. 1, с. 21—29.
25. Молочкина Е.М., Джаман О.М., Озерова И.Б. и др. Там же, 1995, т. 35, вып. 6, с. 860—868.
26. Burlakova E.B., Goloshchapov A.N., Gorbunova N.V. et al. Research Reactor Institute. Ed. T. Imanaka. Kyoto University, Japan, 1998, p. 223—234.
27. Жижина Г.П., Скалацкая С.И., Бурлакова Е.Б. Радиационная биология, 1994, т. 34, вып. 6, с. 759—762.
28. Rozhdestvensky L.M., Fomicheva E.I. Radiat. Prot. Dosim., 1995, v. 62, p. 49—51.
29. Григорьев Ю.Г. Радиационная биология, 1997, т. 37, вып. 4, с. 690—702.
30. Григорьев Ю.Г. Радиационная биология, 1996, т. 36, вып. 5, с. 659—670.
31. Электромагнитные поля. Биологическое действие и гигиеническое нормирование. Под ред. М. Х. Репачоли, Н. Б. Рубцова, А. М. Муц. Женева, ВОЗ, 1999, 541 с.
32. Chatelain E., Boscoboinik D.O., Bartoli J.M., Kagan V.E. Yeu F., Packer L., Azzi A. Biochim. et biophys. acta, 1993, v. 1176, p. 83—89.
33. Пальмина Н.П., Мальцева Е.Л., Курнакова Н.В., Бурлакова Е.Б. Биохимия, 1994, т. 59, с. 193—200.
34. Мальцева Е.Л., Пальмина Н.П., Бурлакова Е.Б. Биол. мембраны, 1998, т. 15, № 2, с. 199—212.
35. Хохлов А.П., Ярыгин К.Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., 1988, т.105, с. 545—547.
36. Молочкина Е. М., Озерова И. Б., Бурлакова Е. Б. Тез. докл. 2-го Международного симпозиума «Механизмы действия сверхмалых доз». Москва, 1995, с. 101.
37. Molochkina E.M., Ozerova I.B., Burlakova E.B. In: Progress in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Eds. A. Fisher, I. Hanin, M. Yoshida. Plenum Press, 1998, № 4, p. 183—186.
38. Озерова И.Б., Молочкина Е.М. Тр. 2-ой Российской конференции «Болезнь Альцгеймера и старение: от нейробиологии к терапии». Ред. С. И. Гаврилова. Москва, 18—20 октября, 1999.
39. Sergeeva M.Y., Gonchar M.V., Chistyakov V.V., Mevkh A.T. Appl. Biochemistry and Biotechnology, 1996, v. 61, p. 167—171.
40. Харриш Г., Диттмаш И. Биол. медицина, 1998, № 3, с. 11—13.
41. Blumenfeld L.A., Grosberg A. Ju., Tichonov A.N. J. Chem. Phys., 1991, v. 95, № 10, p. 7541—7544.
42. Блюменфельд Л.А. Биофизика, 1993, № 1, с. 129—132.
43. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Худяков И.В. Изв. АН. Сер. биол., 1990, № 2, с. 184—193.
44. Аксенов С.И., Бульчев А.А., Грушина Т.Ю. и др. Тез. 2-ого съезда биофизиков России. Москва, 1999, с. 750.
45. Agar D., Moss K., Elias Y., Anbar J. World Scientific. Eds. C. Faddei-Ferretti, P. Marotta. Singapore, New-Jersey, London, Hong-Kong, p. 313—325.
46. Бульченков Н.А. Тез. 2-ого съезда биофизиков России. Москва, 1999, с. 761.
47. Bulienkov N.A. In: Quasycrystals and Discrete Geometry. Ed. J. Patera, Providence R.I., 1998, v.10, p. 67—134.
48. Зенин С.В., Тяглов Б.В. Физ. химия, 1994, т. 68, № 4, с. 636—641.
49. Зенин С.В. Автореф. докт. дисс. «Структурированное состояние воды как основа управления поведением и безопасностью живых систем». Москва, 1999.
50. Lobyshev V.I., Shikhliinskaya R.E., Ryzhikov B.D. J. Mol. Liquids, 1999, v. 82, p. 73—81.
51. Anagnostatos Y.S., Pissis P., Viras K. In: Atomic and Nuclear Clusters. Eds.: Ys. Anagnostatos, W. Von Oertzen. Springer-Verlag, Heidelberg, 1995, p. 215—217.
52. Лященко А.К., Лихолат Т.В. Тез. 2-го съезда биофизиков России. Москва, 23—27 августа 1999, т. 3, с. 815.
53. Вакс В.И., Домрачев Г.А., Родыгин Ю.И. и др. Изв. высш. учеб. заведений. Радиофизика, 1994, № 1, с. 149—154.
54. Коновалихин С.В., Бойков П.Я., Бурлакова Е.Б. Изв. АН. Сер. биол., 2000 (в печати).
55. Бурлакова Е. Б., Бойков П. Я., Панина Р. И., Карцев В. Г. Изв. АН. Сер. биол., 1996, № 1, с. 39—45.
56. Фомина Н. Н., Островская Л. А., Корман Д. Б., Бурлакова Е.Б. Изв. АН. Сер. биол., 1995, № 4, с. 430—434.
57. Островская Л.А., Корман Д.Б., Фомина Н.Н. и др. Там же, 1999 (в печати).
58. Коновалова Н.П., Волкова Л.М., Татьяненко Л.В. и др. Вopr. онкологии, 1997, т. 43, № 3, с. 369—374.