

## Проблема малых и сверхмалых доз в токсикологии.

### Фундаментальные и прикладные аспекты

Доктор технических наук, профессор **В. В. Булатов**, доктор медицинских наук **Т. Х. Хохоев**, кандидат медицинских наук **В. В. Дикий**, кандидат биологических наук **С. В. Заонегин**, кандидат химических наук **В. Н. Бабин**

Одно из важнейших обобщений в токсикологии состоит в признании того, что большей дозе токсиканта соответствует, как правило, большая выраженность биоэффекта. Однако в середине 80-х годов XX столетия в работах ряда исследователей [1—4] были получены неожиданные результаты при изучении закономерностей биоэффектов физиологически активных веществ в области малых и сверхмалых доз или концентраций (в интервале  $10^{-5}$ — $10^{-17}$  *M* и менее). При уменьшении концентрации вещества (на 1—2 порядка) эффект закономерно снижается, затем наступает «зона молчания» (при более низких концентрациях эффект не наблюдается), а далее при еще более низких концентрациях, отличных от первоначальных на 4—6 порядков, эффект возникает снова. Это явление получило название эффекта сверхмалых доз (СМД) или сверхмалых концентраций (СМК).

Такой эффект наблюдался при исследовании разнообразных химических агентов: регуляторов роста растений, противоопухолевых препаратов, нейропептидов и гормонов, иммуномодуляторов, антиоксидантов и других как белковых, так и небелковых соединений.

В то же время была опубликована работа [5], в которой описывалось воздействие физиологически активных веществ в концентрациях от  $10^{-9}$  *M* вплоть до ничтожно малых значений. В этом случае биоэффект приходится на концентрации ниже даже тех, которые используются в гомеопатии — системе лечения ничтожно малыми дозами, предложенной в 1796 году немецким врачом С.Ганеманом. В опубликованном в 1964 г. обзоре [6] обобщены данные, также не поддающиеся объяснению в рамках принятых в токсикологии представлений. В частности, эффект, наблюдаемый в зоне средних доз, в некоторых случаях может быть ниже по сравнению с действием меньших доз. Такой эффект был назван «парадоксальным». Парадоксальные эффекты выглядят провалами

на кривых «доза—эффект». Иногда кривые, описывающие парадоксальную зависимость, имеют два провала.

Авторы работы [6] полагают, что парадоксальные эффекты реализуются гораздо чаще, чем фиксируются в научной литературе. Их не всегда удается наблюдать только потому, что они появляются ниже или выше границ изучаемых концентраций ксенобиотиков или в области промежуточных концентраций, которые не рассматривались. В других случаях, когда парадоксальные эффекты казались совершенно очевидными по экспериментальным данным, их просто не учитывали. Кроме того, парадоксальные эффекты могут выявляться в более отдаленное время, чем это определено рамками конкретного эксперимента. В результате они могут быть просто упущены. Однако, если увеличить время наблюдения за биообъектом, сравнимый эффект может быть достигнут при действии значительно более низких концентраций ксенобиотика.

Общего аналитического выражения дозовой зависимости реакции организма на химическое воздействие в области эффективных доз пока не установлено и все наблюдаемые варианты дозовых зависимостей (имеются в виду аппроксимационные кривые) распределены на три группы [7]: S-образные кривые, показательные (экспоненциальные) кривые и сложные зависимости (парадоксальные эффекты) (рис. 1).

Большинство эмпирических зависимостей «доза—эффект» относится к первым двум группам, применительно к каждой из которых получены соответствующие математические модели [2].

Общеизвестно, что в эксперименте всегда имеет место влияние неконтролируемых факторов, которые могут меняться от эксперимента к эксперименту, что приводит к разбросу данных. В значительной степени именно поэтому в токсикологии существует проблема воспроизводимости

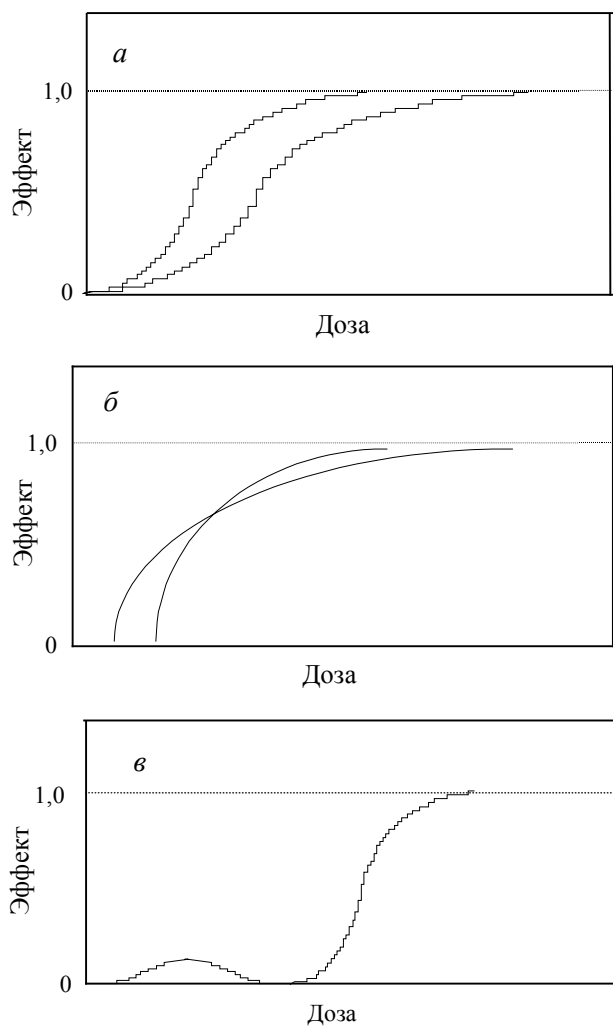


Рис. 1. Основные виды зависимости «доза—эффект»:

- a* — S-образные;
- б* — экспоненциальные;
- в* — бимодальные (парадоксальные)

экспериментальных данных, особенно для условий низких уровней воздействия.

Действительно, реакцию организма на ксенобиотик приходится определять на фоне «шума». Если эффект воздействия ксенобиотика существенен, погрешность в его оценке будет относительно мала. В случае низких доз изменения отдельных признаков у отдельных организмов в ответ на воздействие ксенобиотика могут быть сопоставимы. В этой области погрешность при оценке эффекта особенно ощутима [7]. Сказанное справедливо и в отношении парадоксальных эффектов. Как отмечено в работе [6], «парадоксально, что парадоксальные эффекты не всегда поддаются воспроизведению». Иногда в повторных экспериментах, проводимых с целью воспроизведения парадоксальных эффектов, выявляемые провалы на кривых «доза—эффект» фиксируются при разных концентрациях действующего ксенобиотика [6, 8].

Различные организмы и даже разные линии одного и того же вида, как известно, значительно отличаются друг от друга по

своему биохимическому и физиологическому статусу, что находит отражение в их реакции на воздействие того или иного ксенобиотика. Так, при действии дитиокарбамата на плесень парадоксальная зависимость наблюдается лишь по отношению к некоторым ее видам [9]. Среди многих исследовавшихся при изучении роста бактериальных спор в условиях действия дипиколиновой кислоты парадоксальную зависимость показала только одна линия бактерий [2].

Парадоксальные эффекты широко распространены в физиологии многих биообъектов в самых разнообразных условиях, а также в химических системах [10—13].

В литературе довольно полно описан один из частных случаев бифазной зависимости «доза—эффект», так называемое явление гормезиса [14—18]. Гормезис представляет собой двухфазный ответ на воздействие ксенобиотика — стимуляция эффекта при низкой концентрации и ингибирование — при высокой концентрации (рис. 2).

Гормезис, так же как и парадоксальный эффект в целом, в действительности проявляется гораздо чаще, чем фиксируется в научной литературе. Одна из причин тому, по мнению авторов работы [15], связана с общей тенденцией исследований в токсикологии, а именно, при определении смертельных доз токсичных веществ не учитываются концентрации, при которых только и обнаруживается явление гормезиса.

Хотя парадоксальный эффект имеет место при действии химических веществ на биологические системы разных уровней организации (организменный, клеточный, субклеточный), механизм его в большинстве случаев неясен, и в

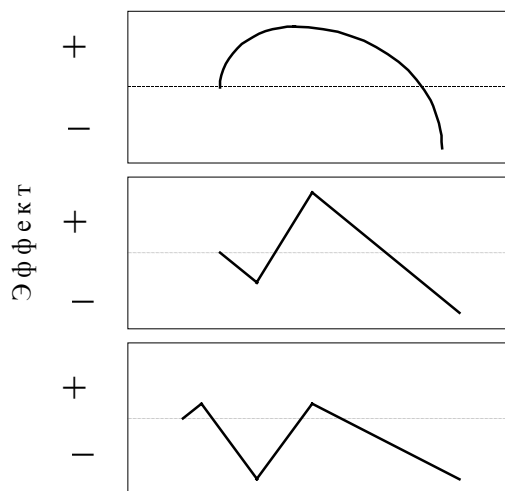


Рис. 2. Типы кривых «доза—эффект», отражающие наличие гормезиса

настоящее время четкое объяснение природы этого феномена отсутствует.

В целом данное явление, как признается современными исследователями, действительно существует. Однако не во всех случаях удается получить достоверное воспроизведение наблюдаемых эффектов при работе с СМД и СМК. Поэтому не случайно видные исследователи, работающие в этой области, весьма осторожны в трактовке данного явления [3].

В настоящее время под малыми дозами биологически активных веществ подразумевают дозы (концентрации) на 1—2 порядка меньше, чем действующие (медианные, пороговые, эффективные и др.). В качестве сверхмалых доз рассматриваются концентрации в интервале  $10^{-18}$ — $10^{-14}$  М, поскольку действие концентраций более  $10^{-12}$  М еще можно как-то объяснить на основе традиционных представлений лиганд-рецепторной кинетики. При концентрациях менее  $10^{-19}$  М в экспериментальном объеме порядка 1 мл может не быть даже одной молекулы вещества. В большинстве исследований биоэффекты не наблюдаются при переходе к концентрациям ниже  $10^{-18}$  М [3].

Характерной особенностью действия веществ в сверхмалых дозах является то, что, несмотря на различный характер контактирующих объектов и соединений, обнаруживаются определенные общие закономерности в проявляемых эффектах [19—24]. Зависимость «доза—эффект» в интервале СМД носит сложный характер и имеет следующие особенности: полимодальность с «мертвой зоной», составляющей по концентрации 2—3 порядка; «перемена знака» активности (стимуляция—ингибирование); практически равные по величине эффекты доз, различающихся на 5—8 порядков.

«Мертвая зона» обычно приходится на интервал концентраций  $10^{-12}$ — $10^{-18}$  М. В больших концентрациях вещество либо не действует, либо дает эффект того же или противоположного знака, что и при действии СМД.

Еще одной парадоксальной особенностью действия СМД является возникновение значительного эффекта вещества в условиях, когда в самом биообъекте эндогенно присутствует намного большая концентрация того же вещества. В обычных условиях, в соответствии с законами равновесной кинетики, добавление малой концентрации вещества к уже имеющейся в системе большой концентрации того же вещества не приводит к заметным эффектам.

Для действия СМД характерна нестабильность наблюдаемых эффектов как по величине, так и по знаку. Кроме того, крайне редко встречается зависимость с насыщением при возрастающих концентрациях, обычная в экспериментах с действующими дозами.

Таким образом, ряд общих закономерностей позволяет выделить эффекты СМД в определенный класс явлений и рассматривать их в целом.

В настоящее время большинство веществ, среди которых обнаружена причастность к эффектам СМД, относятся к веществам, выполняющим регуляторные функции в организме (как правило, это соединения пептидной природы). Однако подобные эффекты СМД выявлены также у веществ небелковой природы, например у нитрозодиметилмочевины, параксона и др. [2, 24].

Особую сложность в проблеме СМД представляют методические аспекты. Они определяют вероятность существования всей проблемы. Методический уровень опубликованных работ примерно одинаков. Исследователи при определении воздействия СМД физиологически активных веществ применяют, как правило, общепринятые или разработанные ими биохимические и физиологические методики с обычным добавлением в инкубационные или реакционные среды различных веществ. При этом изучают действие сверхмалых доз на различные виды биообъектов, отдельные органы, клетки и их функции, ферменты и т.д. Растворы веществ готовят, в основном, по принципу последовательного разбавления. Во многих работах методический аспект практически не освещается, предполагается линейное изменение концентрации исследуемого вещества. Контроль конечных концентраций на уровне  $10^{-15}$ — $10^{-20}$  М чрезвычайно сложен и практически недоступен с помощью существующих наиболее чувствительных методов.

Кроме того, одна из трудностей методического характера связана с исключением влияния примесей, которые содержатся в используемых растворителях. Большое влияние оказывает сорбция веществ, не говоря уже о взаимодействии вещества с растворителем и их примесями. Может сказываться также влияние магнитного поля Земли, радиационного фона и т.д. Особые трудности могут возникать при использовании материалов в клинических исследованиях.

Для исключения подобных воздействий и обеспечения чистоты экспериментов, по-видимому, необходимо применение методов «двойного слепого введения» (в соответствии с требованиями международной системы GLP, *good laboratory practice*) и дополнительного метода для взаимной калибровки, либо требуется изыскание принципиально новых аналитических подходов.

Наибольшие трудности вызывает оценка действия СМД веществ на лабораторных животных. При проведении соответствующих экспериментов исследователи могут столкнуться с компенсаторными и адаптационными реакциями организма. Сроки наблюдения за подопытными животными также могут играть важную роль. Особое место занимает интерпретация данных как свидетельство потенциально патофизиологических процессов. Немалые трудности возникают при переносе полученных показателей токсикологических эффектов на человеческий организм.

Работы по исследованию СМД «страдают» невоспроизводимостью результатов и отсутствием системы в исследованиях.

Несомненно, что решение методических вопросов крайне необходимо для дальнейшего развития исследований эффектов СМД.

Другой фундаментальный аспект проблемы сверхмалых доз связан с выяснением природы эффектов СМД.

К настоящему времени известны следующие гипотезы механизма действия СМД:

- концентрирование действующего вещества;
- наличие исключительно высокоэффективных систем усиления сигнала;
- формирование эффекта в условиях неравновесного связывания лиганда с рецептором;
- адаптационная гипотеза;
- гипотеза, основанная на представлениях о «памяти воды».

Согласно концепции концентрирования, количество вещества в зоне эффекторов, на которые направлено действие, может оказаться на 2—3 порядка больше исходного.

Высокоэффективные системы усиления предполагают наличие такого необходимого фактора, как каскадные реакции, на каждом этапе которых на «выходе» больше активных молекул, чем на «входе». Развитие каскадных реакций сопровождается явлением так называемого рецепторного резерва. При наличии рецепторного резерва для достижения эффекта достаточно, чтобы лиганд связался лишь с некоторой незначительной частью рецепторов на биообъекте. За счет этого явления эффективная концентрация действующего вещества может быть на 1—2 порядка ниже константы диссоциации данного лиганд-рецепторного комплекса. Усиление сигнала возможно не только за счет изменения концентрации вторичных мессенджеров, но также путем активации синтеза белков, участвующих в передаче сигнала.

По гипотезе Е.Б. Бурлаковой [2], для возникновения эффекта достаточно, чтобы биомишени достигали самые «быстрые» молекулы действующего вещества из общего их распределения. Некоторые авторы объясняют эффекты СМД тем, что осуществляется необратимое связывание.

Приведенные гипотезы позволяют объяснить природу эффекта СМД, особенно в случае комбинированного действия ряда факторов, с учетом предположения о наличии в биообъекте нескольких систем усиления сигналов.

Бифазный или полимодальный характер зависимости «доза—эффект» при действии СМД связывают с существованием субпопуляций рецепторов, имеющих различную аффинность к действующему веществу, либо с субпопуляциями клеток. В качестве альтернативы появление биоэффекта объясняют

связыванием лиганда только с определенным количеством рецепторов. При этом эффект будет снижаться по обе стороны от оптимальной концентрации.

Возможность появления неспецифических эффектов при действии СМД соотносят с ростом концентрации действующего вещества.

Наличие «мертвых зон» в зависимости «доза—эффект» может быть результатом компенсации разнонаправленных эффектов действия СМД.

В последнее время для объяснения механизма действия СМД выдвигается гипотеза, основанная на представлениях о «памяти воды». Суть ее заключается в том, что вещество, растворяясь в воде, создает «фантом» структуры этого вещества, а при дальнейшем разбавлении происходит, подобно действию затравки при кристаллизации, процесс самокопирования этих структурных «фантомов».

Все рассмотренные гипотезы дают возможность объяснить наблюдаемые эффекты СМД, однако они не позволяют получить единой картины явления, а описывают только отдельные особенности действия СМД.

Концепция адаптационного механизма действия СМД (С.В. Зайцев, Л.А. Сазанов [23]), по мнению авторов, позволяет объяснить все основные закономерности эффектов. Гипотеза базируется на экспериментальных данных о действии сверхмалых концентраций вещества на фоне имеющейся в организме значительно большей эндогенной концентрации того же вещества. Механизм этого явления основан на предположении о протекании быстрой и медленной реакций с противоположным вкладом в эффект. Такая система обладает высокой чувствительностью — биомишень реагирует на очень малые изменения концентрации вещества, что соответствует связыванию лиганда с одним-единственным рецептором.

Данное явление также называют «клеточной памятью», поскольку клетка как бы помнит концентрацию, которая воздействовала на нее в предыдущий момент времени. Подобные механизмы применимы к регуляторным процессам, особенно сопровождаемым развитием адаптации. С помощью адаптационной гипотезы, по мнению авторов, можно объяснить такие общие закономерности действия СМД, как наличие максимума на кривой «доза—эффект», существование «мертвой зоны» при относительно больших концентрациях, появление эффекта при СМД. Однако следует отметить, что эта гипотеза основана на экспериментальных данных о действии вещества в СМД при наличии эндогенных концентраций этого вещества в биообъекте и описывает лишь действие СМД веществ регуляторного типа (пептиды, ФАТ и др.), в то время как эффекты СМД выявлены и у ряда ксенобиотиков. Если данная гипотеза применима и к веществам этого типа, то следует предположить необходи-

мость предварительного их накопления в биомишени для проявления эффектов СМД при повторных воздействиях.

Подождивая обсуждение современного состояния проблемы малых и сверхмалых доз, с определенностью пока можно утверждать, что эффекты СМД физиологически активных веществ представляют собой реальное биологическое явление и имеют ряд общих закономерностей.

В настоящее время, как и на первых этапах обнаружения и исследования эффектов СМД, идет накопление фактов. Решение этой проблемы позволит уточнить наиболее тонкие механизмы функционирования организма в целом, выявить возможные каскадные механизмы его функционирования и определить изменение чувствительности организма к действию повреждающих факторов.

Изучение природы и механизмов действия СМД физиологически активных веществ несомненно внесет существенный вклад в практическую медицину (пересмотр доз лекарственных веществ и открытие новых направлений их создания).

Факт существования эффекта СМД может повлиять на решение экологических проблем и на оценку предельно допустимых концентраций ксенобиотиков, что особенно важно для работ по уничтожению химически опасных продуктов, в частности отравляющих веществ.

С практической точки зрения исследование проблемы СМД представляет интерес и в связи с возможной ролью сверхмалых доз в индуцировании у человека таких патологических проявлений, как «множественная химическая чувствительность», или «болезнь окружающей среды», «синдром войны в Персидском заливе». В данном случае предполагается новый взгляд на токсичность, которая зависит не столько от уровня дозы, сколько от особенностей взаимодействия доза—биообъект. Не исключено, что после «воздушной войны» в Югославии мы можем столкнуться с новыми видами проявлений эффекта СМД.

Таким образом, исследование проблемы СМД является важной задачей, ее решение может привести к уточнению взглядов на токсичность ксенобиотиков, к изменению подходов к применению лекарственных средств и к пересмотру многих принципов в биологии и медицине.

#### 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., Конрадов А.А., Худяков И.В. Изв. АН СССР. Сер. биол., 1990, № 2, с. 184—193.
3. Ашмарин И.П., Каразеева Е.П., Лелекова Т.В. Мат. 5-ой Межд. конф. Лики России, Спб., 1996, с. 29—33.
4. Зайцев С.В., Кошкин А.А., Сазанов Л.А., Судьина Г.Ф. Тр. раб. совещ. по слабым хим. и физ. воздействиям на биосистемы. Черноголовка, 9—12 октября 1990 г.
5. Benveniste E.N., Meprill J.E. Nature 321, 1970: 610—613 86 34R.
6. Schatz A., Schalscha E.B., Schatz V. Compos. Sci., 1964, № 1, p. 26—30.
7. Копанев В.А., Гинзбург Э.Х., Семенова В.Н. Метод вероятностной оценки токсического эффекта. Новосибирск: Наука, 1988, 124 с.
8. Nyilasi J. Acta chim. Acad. sci. hung., 1962, v. 34, № 2, p. 229—239.
9. Nyilasi J., Vargha E. Ibid., 1958, v. 14, № 1—2, p. 113—123.
10. Nyilasi J. Ibid., 1958, v. 15, № 1, p. 51—63.
11. Nyilasi J. Annales Universitatis Scientiarum Budapestinensis de Rolando Eotvos Nominata, Sectio Chimica, 1962, № 4, p. 89.
12. Зенгуш П. Молекулярная и клеточная биология. Т. 1. М.: Мир, 1982, 367 с.
13. Calabrese T.I., Mc Carthy M., Kenyon E. Health Phys., 1987, v. 52, № 5, p. 534—541.
14. Stebbing A.R.D. Sci. Total Environ., 1982, v. 22, № 3, p. 213—234.
15. Boxenbaum H., Neafsey P.J., Fournier D.I. Drug Metab. Rev., 1988, v. 19, № 2, p. 195—229.
16. Totter J.R. Health Phys., 1987, v. 52, № 5, p. 549—551.
17. Robertson A.D.I., Grutsch J.F. J. Theor. Biol., 1987, v. 125, № 1, p. 41—60.
18. Williamson S.A., Knight R.A., Lightman S.L., Hobbs J.R. Brain beh Immun., 1985, v. 1, p. 329—335.
19. Zakharova L.A., Belevskaya R.G., Ynovskii O.G. Biomed. Sci., 1990, v. 1, № 1, p. 139—143.
20. Богатыренко Т. Н., Редкозубова Г. П. Конрадов А.А. Бурлакова Е.Б. Биофизика, 1989, т. 34, с. 327—329.
21. Munn N.A., Lum L.G. Clin. Immunol. and Immunopathol., 1989, v. 52, № 3, p. 376—385.
22. Kats L.S., Marquis J.K. Toxicol. and Appl. Pharmacol., 1989, v. 101, № 1, p. 114—123.
23. Zaitsev S.V., Sazanov L. A. Chem. and Biochem. Kinet., 1991, v. 1, № 3, p. 21—26.
24. Шангин-Березовский Г.Н., Молоскин С.А., Рыхлецкая О.С. В кн.: Химический мутагенез в создании сортов с новыми свойствами. Под ред. И.А. Рапопорта. М.: Наука, 1986, с. 243—249.