

## Фармакокинетический анализ бимодальных дозовых зависимостей

Кандидат биологических наук **К. Г. Гуревич**

Традиционно в фармакологии принято считать, что биологический ответ пропорционален силе воздействия на систему, при этом в случае чрезмерной силы возможно угнетение ответа из-за истощения «внутреннего резерва» клеток [1]. В последние годы на базе обширного материала, полученного при изучении эффектов различных биологически активных веществ, было показано, что дозовая зависимость имеет более сложный характер: воздействия малой силы вызывают клеточный ответ, на воздействия средней силы ответ отсутствует и снова проявляется на более интенсивные силы (рис. 1). Такие бимодальные дозовые кривые описаны для большого числа биологически активных веществ [2—28] (см. таблицу), они характерны также для действия ионизирующей радиации [29, 30].

При всем разнообразии химической природы веществ, вызывающих бимодальные эффекты, и различии этих эффектов есть одно общее свойство: все вещества, представленные в таблице, не влияют на клеточные функции непосредственно, а оказывают влияние опосредованно, через системы проведения и усиления сигнала, т.е. все эти вещества имеют регуляторную природу. Исходя из такого заключения, мы разработали возможный механизм формирования бимодальных дозовых зависимостей [31], основанный на свойствах систем каскадного проведения и усиления рецепторного сигнала в предположении, что некоторые из каскадных реакций имеют системы обратной связи (суб-

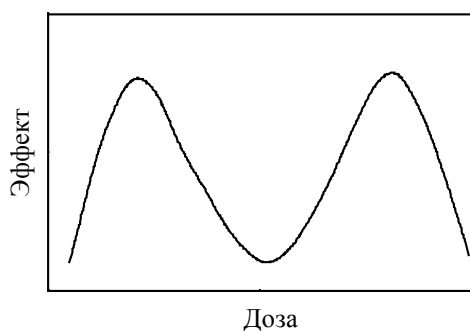


Рис. 1. Бимодальная зависимость «доза—эффект»

стратное торможение, ингибирование избытком продукта и т.д.).

В настоящей статье дан фармакокинетический анализ развития биологического ответа для бимодальных дозовых зависимостей.

В живых системах биологический ответ возникает в результате связывания клеточных рецепторов с эндогенными или экзогенными лигандами [32, 33]. В большинстве случаев эти лиганды не вырабатываются непосредственно в месте действия, а поставляются при транспортировании по системе крови, лимфатической, межтканевой жидкости и т.д. Такому транспорту в простейшем случае отвечает линейная фармакокинетическая модель, представленная на схеме 1:

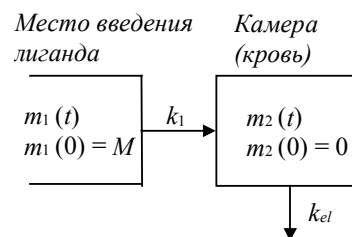


Схема 1

где  $m_i$  — масса лиганда в камерах;  $k_1$ ,  $k_{el}$  — константы процессов поступления лиганда в кровь и элиминации лиганда из крови.

Большинство лигандов обратимо связываются с белками крови, при этом основными белками-переносчиками являются альбумины. Этому процессу отвечает схема:



где L — лиганд; P — белок-переносчик; LP — их комплекс; K — константа диссоциации.

Обычно концентрация лиганда много меньше концентрации связывающего белка. Так, например, концентрация альбуминов составляет порядка  $10^{-5} M$ , а концентрация гормона роста — фактора роста нервных клеток составляет  $10^{-9}$ — $10^{-11} M$  [27].

Таблица

## Примеры биологически активных веществ, вызывающих бимодальные эффекты

Вещества	Биологический ответ	Объект воздействия	Ссылка
<b>Неорганические соединения</b>			
Ионы меди	Термостабильность	Клетки дуаниеллы	[2]
	Теплоустойчивость	Мембраны тилакоиды	[3]
Ионы кальция	Проницаемость	Хлорные каналы	[4]
Пероксид водорода	Повреждающая активность	Клеточная линия V79	[5]
	Повреждение ДНК	<i>E. coli</i>	[6]
<b>Непептидные органические соединения</b>			
200 токсинов	Захват нейтрального красителя	Фибробласты	[7]
Трициклические антиде- прессанты	Активность моноаминокси- дазы	Головной мозг, тромбоциты	[8]
Фенозан, $\alpha$ -токоферол	Каталитическая активность	Протеинкиназа С	[9]
Форболовый эфир	Активация клеток	В-клетки	[10]
Имазалил	Рост клеток	Семена гороха, водоросль <i>Scendesmus</i>	[3]
Органические пероксиды	Рост биомассы	Клетки культуры табака	[11]
Форсколин	Генерация активных форм кислорода	Остеопласты	[12]
Простангландин E <sub>2</sub>	Пролиферация	Лимфоциты	[13]
Никотин	Тревога	Крысы	[14]
Трансформированный ростовой фактор $\beta$	Секреция инсулина	Клеточная линия MIN6	[15]
Фактор роста опухолей $\beta$	Пролиферация	Культура гладкомышечных клеток	[16]
$\beta$ -Блокаторы	Частота, сила сокращений	Культура кардиомиоцитов	[17]
$\beta$ -Субъединица холерного токсина	Рост клеток	Культура клеток 3T3	[18]
Малеиновый ангидрид	Цитотоксичность	НК-клетки	[19]
<b>Пептидные соединения</b>			
Трансглутаминаза	Сродство адренорецепторов к лигандам	Нейробластома	[20]
Нейропептид Y	Пищевая мотивация	Крыса	[21]
Опиоидные пептиды	Высвобождение энкефалинов	Бледное тело	[22]
	Активность аденилатциклазы	Клетки из <i>Myenteric plexus</i>	[23]
Мет-энкефалин	Пролиферация	Лимфоциты	[24]
Интерлейкин-1	Активность цитохрома P450	Гепатоциты	[25]
	Стимуляция роста клеток	$\beta$ -Клетки	[26]
Гормон роста	Секреция и клиренс	Человек	[27]
<i>l</i> -Формилметионил- лейцинфенилаланин	Продукция свободных форм кислорода	Нейтрофилы	[28]

Поэтому концентрацию белка-переносчика во взаимодействии, описываемом схемой (2), можно считать неизменной. Тогда концентрацию комплексов лиганда с транспортными белками можно описать следующим уравнением (аналог уравнения Кларка для рецепторного связывания):

$$[LP] = \frac{[L_0][P]}{[L_0] + K}, [P] = [P_0] \quad (3)$$

где  $[L_0]$ ,  $[P_0]$  — начальные концентрации лиганда и белка-переносчика.

Для большинства лигандов  $K \gg [L_0]$ , и (3) можно привести к виду:

$$[LP] = \alpha[L_0] \quad (4)$$

где  $\alpha = [P]/K$  — константа, так как в норме концентрация транспортных белков крови поддерживается в организме на постоянном уровне.

Соответственно концентрация свободного лиганда определяется формулой:

$$[L] = (1 - \alpha)[L_0] = \beta[L_0] \quad (5)$$

где  $\beta$  — константа, «степень связывания». Если  $\beta = 0$ , то весь лиганд находится в связанном виде.

В рамках фармакокинетической модели (1) возможно выведение только связанной формы лиганда (например для билирубина) или только свободной формы (например для стероидных гормонов). Тогда для схемы (1) уравнения закона действующих масс запишутся так:

$$\begin{aligned} \frac{dm_1}{dt} &= -k_1 m_1, \quad m_1(0) = M \\ \frac{dm_2}{dt} &= k_1 m_1 - \gamma k_{el} m_2, \quad m_2(0) = 0 \end{aligned} \quad (6)$$

где  $\gamma$  — константа, учитывающая выведение из крови только связанной формы лиганда, тогда  $\gamma = \beta$  (уравнение 5), или только свободной формы лиганда, тогда  $\gamma = \alpha$  (уравнение 4).

Решением системы (6) будет уравнение

$$m_2 = M(e^{-k_{el}\gamma t} - e^{-k_1 t}) \quad (7)$$

С практической точки зрения удобнее использование концентрации, а не массы лиганда. Тогда (7) преобразуется к виду:

$$C(t) = C_0(e^{-k_{el}\gamma t} - e^{-k_1 t}) \quad (8)$$

где  $C(t) = m(t)/V$  — концентрация лиганда;  $V$  — объем камеры (для крови 5 л);  $C_0$  — начальная эффективная концентрация лиганда.

Как было указано выше, для того чтобы вызвать биологический ответ, лиганд в свободной форме должен вступить во взаимодействие с клеточным рецептором:



где R — рецептор; LR — лиганд-рецепторный комплекс;  $K_d$  — константа диссоциации комплекса.

Концентрация лиганд-рецепторных комплексов зависит от соотношения концентраций лиганда и рецептора и от модели рецепторного связывания [33]. Но нас интересует не количество связанного лиганда, а конечный клеточный ответ. Формирование этого ответа осуществляется посредством системы проведения и усиления рецепторного сигнала (см. схему 2).

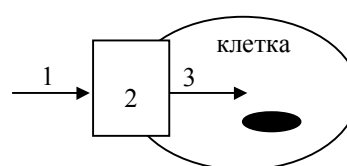
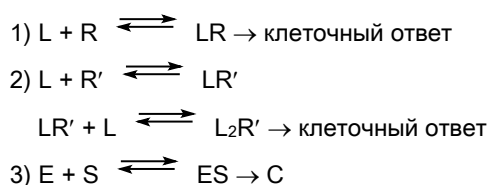


Схема 2

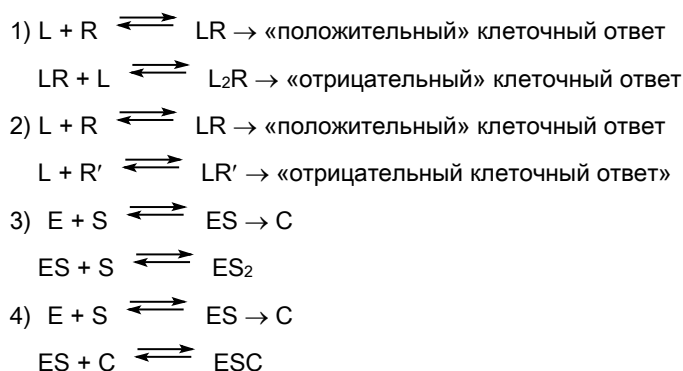
где 1 — поступающий сигнал (концентрация свободного лиганда); 2 — система проведения и усиления рецепторного сигнала; 3 — клеточный ответ.

Чтобы провести кинетическое описание конечного клеточного ответа, формируемого согласно представленной схеме, мы классифицировали основные модели проведения и усиления сигнала следующим образом. К схемам первого типа были отнесены те, для которых характерен выход дозовой кривой на плато, к схемам второго типа — те, для которых на дозовой кривой имеется максимум (схемы с обратной связью).

*Кинетические схемы первого типа:*



*Кинетические схемы второго типа:*



где E — фермент; S — субстрат; ES — фермент-субстратный комплекс; C — продукт ферментативной реакции.

Можно показать, что для кинетических схем первого типа (см. схему 1) с точностью до первых рядов разложения в ряд Тейлора клеточный ответ  $y$  зависит от поступающего сигнала  $z$ , например от концентрации лиганда, следующим образом:

$$y = \frac{Az}{1+z} \quad (10)$$

Для процесса, описываемого схемой 2, выполняется зависимость:

$$y = \frac{Az^2}{1+z^2} \quad (10')$$

где  $A$  — коэффициент пропорциональности, учитывающий усиление ( $A > 1$ ) или ослабление ( $0 < A < 1$ ) сигнала.

Если изменение концентрации лиганда задается уравнением (8) и только свободный лиганд (уравнение 5) может вызвать клеточный ответ, то сигнал  $z$  описывается формулой:

$$z(t) = [L](t) = \beta C_0 (e^{-k_{el}t} - e^{-k_1 t}) \quad (11)$$

Для схем второго типа величину  $y$  можно описать уравнением:

$$y = Aze^{-z} \quad (12)$$

Нами был произведен численный расчет процесса развития клеточного ответа во времени для схем первого и второго типов (рис. 2). Величины  $k_{el}$  и  $k_1$  были взяты из

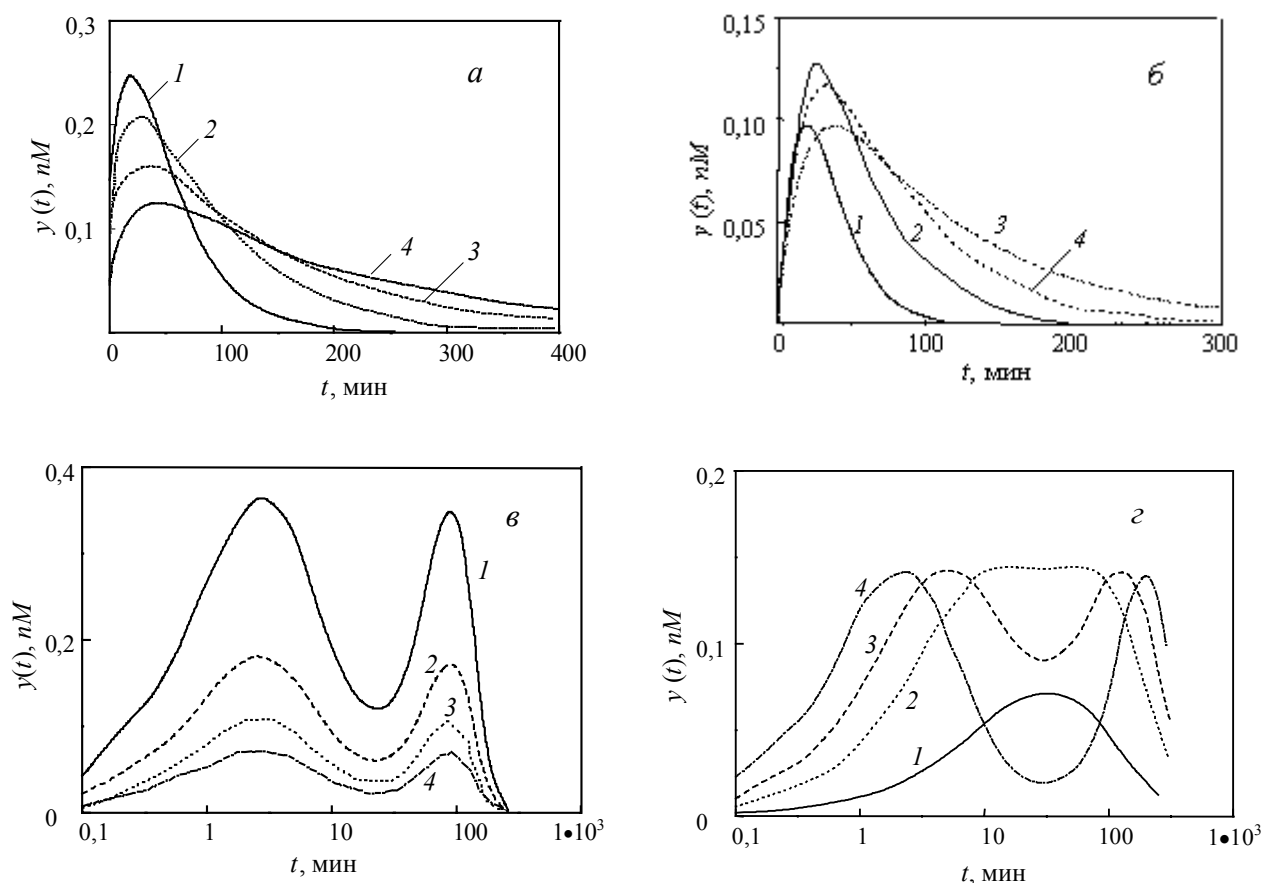


Рис. 2. Развитие биологического ответа во времени.

Для  $a$  и  $б$  поступающий сигнал  $z$  определяется уравнением (11), ответ  $y$  — уравнением (10) ( $a$ ), (10') ( $б$ );  $k_1 = 0,0277 \text{ мин}^{-1}$ ,  $k_{el} = 0,0714 \text{ мин}^{-1}$ ,  $C_0 = 1 \text{ нМ}$ ,  $A = 1$ ,  $\gamma = \beta \sim 1$  (1); 0,5(2); 0,3(3); 0,2(4).

Для  $в$  и  $г$  сигнал  $z$  определяется уравнением (11), ответ  $y$  — уравнением (12);  $k_1 = 0,0277 \text{ мин}^{-1}$ ,  $k_{el} = 0,0714 \text{ мин}^{-1}$ ,  $A = 1$ ,  $\gamma = \beta$ ;  $в$  —  $C_0 = 1 \text{ нМ}$ ;  $\beta = 1$  (1), 2(2), 3(3), 2(4);  $г$  —  $\beta = 0,388$ ,  $C_0$  (в пМ) 1(1), 5(2), 10(3), 20(4).

работы [27] для гормона роста. Для схем первого типа наблюдается мономодальная дозовая фармакокинетическая зависимость (рис. 2 а, б), при этом время наступления максимума эффекта и время развития биологической реакции зависят от степени связывания лиганда с белком-переносчиком. Это действительно было показано в работе [27], в которой изучались эффекты гормона роста и его аналогов при введении их людям разных возрастных категорий, при ассоциации с различными белками-переносчиками, при введении разных доз гормона.

Для схем второго типа фармакокинетическая дозовая зависимость имеет два максимума (бимодальные кривые на рис. 2 в, г), при этом величины максимумов и наличие бимодального эффекта зависят от концентрации лиганда и параметров его ассоциации с белками-переносчиками, что соответствует результатам работы [27]. Незначительные изменения в этих величинах могут привести к драматическому изменению формы клеточного ответа.

### Заключение

Белковые транспортные системы млекопитающих характеризуются гетерогенностью связывающих белков [34]. В соответствии с полученными результатами в случае бимодальных зависимостей «доза—эффект» биологический ответ живых систем будет определяться не только дозой биологически активного вещества, как это обычно принято считать в фармакологии, но также и связыванием с белками-переносчиками. Концентрация лиганда и его связывание с транспортными системами влияет не только на величину, но и на форму биологического ответа, включая межпиковый период на бимодальной дозовой кривой и саму возможность формирования бимодального ответа. Изменение этих параметров может привести к трансформации формы фармакокинетической кривой от мономодальной к бимодальной и наоборот.

Характер зависимости «доза—эффект» имеет существенное значение для медицины. Это связано с тем, что достаточно часто в терапевтических целях используются синтетические аналоги гормонов (пероральная контрацепция, гормонозаместительная терапия и т.д.), которые имеют иное сродство к транспортным белкам крови, чем природные соединения. Применение подобных препаратов может привести к извращению биологического ответа не только по величине, но и по форме. Поэтому назначение синтетических аналогов гормонов отнюдь не столь безо-

пасно и безразлично для организма, как это может показаться на первый взгляд.

Кроме того, при многих патологических состояниях организма изменяется продукция гормонов, что наиболее характерно для новообразований из гормонпродуцирующих тканей. В частности, описано изменение концентрации в крови при поликистозе яичников половых гормонов, белка, связывающего половые гормоны, а также отношения концентраций свободных и связанных половых гормонов [35]. Как следует из наших результатов, это может привести к принципиальным изменениям биологического ответа на половые гормоны не только по силе, но и по форме.

Поэтому следует соблюдать большую осторожность при испытании новых лекарственных средств, имеющих регуляторные механизмы действия, оценивая не только их фармакокинетический профиль, но и развитие биологического ответа. Чтобы быть уверенным в отсутствии (наличии) бимодальной дозовой зависимости, требуется проведение всесторонних детальных исследований при достаточно длительном диапазоне времен и с использованием исследуемого фармакологического препарата в широком интервале концентраций. Кроме того, необходимо исследовать зависимость биологического ответа от концентрации связывающих белков: у лиц разных возрастных категорий, при гипоальбуминемии, глобулинемии, новообразованиях и т.д.

В случае лекарственных веществ, не имеющих регуляторного механизма (антибиотики), изменение дозировки и связывания с белками-переносчиками может повлиять на их максимальную терапевтическую концентрацию и длительность циркуляции в крови (аналогично данным, приведенным на рис. 2 а, б). Несмотря на то, что лекарственные вещества, не имеющие регуляторной природы, не вызывают дозозависимых изменений формы биологического ответа, знание зависимости «доза—эффект» все же необходимо, поскольку возможны модификации в величине биологического ответа, а также в частоте назначения препарата при изменении их дозировки и/или связывании с белками крови.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Галактионов С.Г., Голубович В.П., Шендерович М.Д., Ахрем А.А. Введение в теорию рецепторов. Минск: Наука и техника, 1986, 199 с.
2. Веселова Т.В., Веселовский В.А., Чернавский Д.С. Стресс у растений. М.: Изд-во МГУ, 1993, 144 с.

3. Веселовский В.А., Веселова Т.В., Чернавский Д.С. Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева), 1999, т. XLIII, № 5, с. 49—54.
4. Kuruma A., Hartzell H.C. J. Gen. Physiol., 2000, v. 115, № 1, p. 59—80.
5. Kaneko M., Kodama M., Inoue F. Free Radic. Res., 1994, v. 20, № 4, p. 229—239.
6. Imlay J.A., Linn S. J. Bacteriol., 1986, v. 166, № 2, p. 519—527.
7. Holzhutter H.G., Quedenau J. J. Biol. Systems, 1995, v. 3, № 1, p. 127—138.
8. Reid AA, Hill JL, Murphy DL. Naunyl Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 1988, v. 338, p. 678—683.
9. Пальмина Н.П., Мальцева Е.Л., Пынзарь Е.И., Бурлакова Е.Б. Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева), 1999, т. XLIII, № 5, с. 55—62.
10. Mond J.J., Feuerstein N., June C.H. e. a. J. Biol. Chem., 1991, v. 266, № 7, p. 4458—4463.
11. Богатыренко Т.Н., Редкозубова Г.П., Конрадов А.А. и др. Биофизика, 1989, т. 34, № 2, с. 327—329.
12. Berger C.E., Datta H.K. Exp. Physiol., 2000, v. 85, № 1, p. 57—60.
13. Sergeeva M.G., Gonchar M.V., Mevkh A.T., Varfolomeev S.D. FEBS Lett., 1997, v. 418, p. 235—238.
14. File S.E., Kenny P.J., Ouagazzal A.M. Behav. Neurosci., 1998, v. 112, № 6, p. 1423—1429.
15. Sekine N., Yamashita N., Kojima I. e. a. Diabetes Res. Clin. Pract., 1994, v. 26, № 1, p. 7—14.
16. Battegay E.J., Raines E.W., Seifert R.A. e. a. Cell, 1990, v. 63, № 3, p. 515—524.
17. Moins N., Renoux M., Boucher M., Gachon P. In Vitro Cell Dev. Biol., 1991, v. 27A, № 2, p. 147—150.
18. Buckley N.E., Matyas G.R., Spiegel S. Exp. Cell Res., 1990, v. 189, № 1, p. 13—21.
19. Piccoli M., Saito T., Chirigos M.A. Int. J. Immunopharmacol., 1984, v. 6, № 6, p. 569—576.
20. Zhang J., Tucholski J., Lesort M. e. a. Biochem. J., 1999, v. 343, part 3, p. 541—549.
21. Borisova E.V., Kadar T., Telegdy G. Acta Physiol. Hung., 1991, v. 78, № 4, p. 301—308.
22. Olive M.F., Maidment N.T. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1998, v. 285, № 3, p. 1310—1316.
23. Wang L., Gintzler A.R. J. Neurochem., 1994, v. 63, № 5, p. 1726—1730.
24. Дубинин К.В. Автореф. дисс.... канд. хим. наук, Москва, 1997, 20 с.
25. Nikolova-Karakashian M., Morgan E.T., Alexander C. e. a., J. Biol. Chem., 1997, v. 272, № 30, p. 18718—18724.
26. Spinass G.A., Palmer J.P., Mandrup-Poulsen T. e. a. Acta endocrinol., 1988, v. 119, № 2, p. 307—311.
27. Veldhuis J.D., Johnson M.L., Faunt L.M. e. a. J. Clin. Invest., 1993, v. 91, p. 629—641.
28. Bellavite P., Chirumbolo S., Lippi G. e. a. Cell Biochem. Funct., 1993, v. 11, p. 93—100.
29. Бурлакова Е.Б. Вестн. РАН, 1994, т. 64, № 5, с. 425—431.
30. Спитковский Д.М. Радиобиология, 1992, т. 32, № 3, с. 382—399.
31. Гуревич К.Г., Шимановский Н.Л. Вop. биологической, медицинской и фармацевтической химии, 2000, № 3, с. 45—48.
32. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И. Рецепторы физиологически активных веществ. Москва, Волгоград: Семь ветров, 1999, 37 с.
33. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика. Практический курс. М.: Фаир-пресс, 1999, 720 с.
34. Barnard R., Wolff R. J. Theor. Biol., 1998, v. 190, p. 333—339.
35. Hamilton-Fairley D., White D., Griffiths M. e. a. Clin Endocrinol. (Oxf), 1995, v. 43, p. 159—165.