

УДК 541.1

ЗАКОНОМЕРНОСТИ И ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ СВЕРХМАЛЫХ ДОЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

К. Г. Гуревич

(кафедра химической энзимологии)

Рассмотрены основные закономерности действия биологически активных веществ (БАВ) в сверхмалых дозах. Наблюдаемый во многих экспериментах разброс данных может быть объяснен за счет связывания единичных молекул БАВ с их эффекторами, при этом, исходя из теоретических расчетов, коэффициент вариации равен $1/\sqrt{N}$ (N – число комплексов лиганд-рецептор), что соответствует экспериментальным данным. Развивающийся биологический ответ при связывании единичных молекул объясняется наличием высокоэффективных систем проведения и усиления рецепторного сигнала, что соответствует «классической» теории «свободных рецепторов» Стефферсона. Отсутствие биологического ответа в области 10^{-8} – 10^{-12} М можно объяснить существованием двух систем с отрицательными обратными связями (субстратное торможение, ингибирование избытком продукта и т.д.). Описаны закономерности развития биологического ответа во времени при действии сверхмалых доз: наличие бимодальных эффектов определяется введенной дозой БАВ.

Впервые врачевание малыми дозами было предложено в 1790 г. Самуилом Ганеманом. Он же предложил принцип *similia similibus curantur* (подобное лечится подобным), благодаря которому его метод получил названия *гомеопатии* (греч. *homoios* – подобный, *pathos* – страдание). Казалось бы, с развитием медицины и фармакологии в XX в. гомеопатическая школа должна прекратить свое существование. Невоспроизводимость результатов, нестабильность эффектов лечения, невозможность их объяснения с научной точки зрения – вот основные недостатки гомеопатии. Однако в последние годы стал наблюдаться возрастающий интерес исследователей к действию сверхмалых доз биологически активных веществ. Например, в базе данных «MEDLINE» (1994–1999) можно найти более 1200 ссылок на публикации, посвященные действию сверхмалых доз. Опубликованы данные для разнообразных групп биологически активных веществ (гормонов, эндогенных регуляторных пептидов, некоторых непептидных веществ и т.д.).

При этом следует отметить, что общепринятого определения сверхмалых доз нет, и разные авторы указывают разные цифры. Никаких обоснований при этом зачастую не приводится, кроме того, многие авторы путают понятия «доза» и «концентрация». В частности, в работе [1] под сверхмалыми дозами понимаются концентрации бруфена более низкие, чем приведенные ранее в литературе (10^{-10} – 10^{-14} М). Согласно Е.Б. Бурлаковой и соавт. (1990), под сверхмалыми дозами понимаются концентрации биологически активных веществ ниже 10^{-12} М [2], при этом никаких обоснований для такого определения сверхмалых доз не приводится. По определению Л.А. Сазанова и С.В. Зайцева (1992), сверхмалыми дозами считаются концентрации в диапазоне 10^{-18} – 10^{-14} М, так как при этом наблюдается связывание единичных молекул лиганда с рецепторами [3].

С нашей точки зрения, правильной понимать под сверхмалыми дозами, обеспечивающие концентрацию биологически активного вещества (БАВ) в месте действия

на несколько порядков ниже константы диссоциации БАВ с эффектором (обычно константа диссоциации для рецепторов составляет порядка 10^{-9} – 10^{-12} М, с ферментом – 10^{-5} – 10^{-7} М [4]). Однако необходимо оговориться, что при концентрациях ниже 10^{-20} М вероятность нахождения хотя бы одной молекулы БАВ в 1 мл жидкости близка к нулю, поэтому для объяснения подобных эффектов используют такие понятия, как «активированная вода», «память молекул» [5, 6], «биоактивация» [7], мы не будем их рассматривать, так как они лишены физического смысла.

Если сверхмалые дозы оказывают достоверное воздействие на биологический объект, то они являются действующими дозами. Если сверхмалые дозы на биологические объекты не влияют, то их изучение не имеет смысла. В этой связи выделение сверхмалых доз необходимо только по отношению к взаимодействию лигандов с рецепторами: если взаимодействуют единичные молекулы лиганда с рецепторами, то лиганд-рецепторное взаимодействие носит вероятностный характер и наблюдаются случайные флуктуации количеств связанного с рецепторами лиганда (данный вопрос подробнее рассматривается ниже).

Действительно, доказано, что биологические эффекты могут вызываться единичными молекулами [2, 3]. В частности, в работе [8] показано сохранение биологических эффектов ферромона при разбавлении до 36 молекул в 1 мкл.

Исследование действия сверхмалых доз представляет значительный интерес, так как может привести к созданию новых лекарственных веществ или к описанию новых существенно важных свойств уже известных БАВ. Кроме того, изучение действия сверхмалых доз биологически активных веществ может помочь объяснить эффекты ряда гомеопатических препаратов.

Закономерности действия сверхмалых доз

При анализе литературных данных, посвященных действию сверхмалых доз, обращает на себя внимание

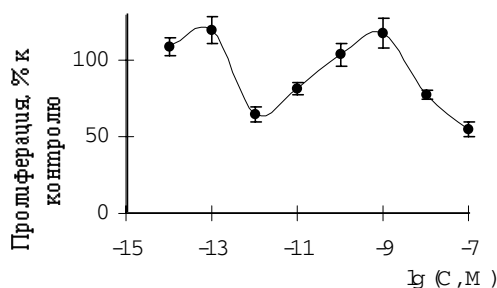


Рис. 1. Влияние простагландина E_2 на пролиферацию лимфоцитов селезенки мыши [9]

отсутствие эффектов в области концентраций 10^{-12} – 10^{-8} М (так называемая «мертвая зона»). Фармакологи, изучая действие различных БАВ, не наблюдали никаких эффектов при достаточно низких концентрациях и считали, что при еще более низких концентрациях эффектов тем более не будет. Однако в настоящее время показано обратное: при действии сверхмалых доз на биологические объекты могут наблюдаться достоверные эффекты, которые могут как отличаться от обнаруженных при действии больших доз, так и совпадать с ними. Следовательно, необходимо изучение эффектов БАВ во всем диапазоне концентраций (от атомарных до молярных). Отсутствие эффекта при достижении «достаточно больших» (или «достаточно низких») концентраций не означает его отсутствия при действии более высоких (более низких) концентраций.

Для многих веществ было показано, что эффекты сверхмалых доз примерно совпадают по силе и величине с наблюдаемыми при действии больших. При этом кривая «доза–эффект» имеет бимодальный характер [9] (рис. 1).

Однако эффекты сверхмалых доз нестабильны. Многие авторы расценивают действие сверхмалых доз как парадоксальное, потому что эффекты наблюдаются в области концентраций, которые на несколько порядков меньше константы связывания лигандов с рецепторами. Многие эксперименты оказываются невоспроизводимыми и в одних и тех же условиях эффекты сверхмалых доз могут различаться не только по силе, но и по знаку [2, 3]. Это дает основание многим авторам сомневаться в достоверности эффектов сверхмалых доз биологически активных веществ.

В доступной литературе до сих пор нет теории, которая бы полностью объясняла все эффекты действия сверхмалых доз биологически активных веществ. Наблюдаемые эффекты пытаются объяснить при помощи следующих гипотез: концентрирование лекарственного вещества, наличие высокоэффективных систем проведения и усиления рецепторного сигнала, «адаптации» рецепторов к действию сверхмалых доз [3], существованием супервысокоаффинных рецепторов [2].

Молекулярные механизмы действия сверхмалых доз БАВ

С нашей точки зрения, наиболее вероятным объяснением эффектов сверхмалых доз биологически активных веществ представляется существование высокоаффинных

систем проведения и усиления рецепторного сигнала. Действительно, один G-белок (сопряженный рецептор), находясь в активном состоянии, может взаимодействовать с 10–100 другими G-белками. Один G-белок способен проактивировать 10–100 аденилатциклаз. Одна активная аденилатциклаза способна катализировать образование до 1000 молекул цАМФ. Тем самым рецепторный сигнал может быть усилен в 10^6 – 10^{10} раз [4, 10]. Заметим, что еще более мощные системы усиления сигнала наблюдаются для другого внутриклеточного мессенджера – иона кальция [10]. Существованием столь мощных систем проведения и усиления рецепторного сигнала можно объяснить действие сверхмалых доз БАВ.

Таким образом, биологический ответ может быть получен при оккупации незначительной части рецепторов. Данное предположение перекликается с «классической» теорией «свободных рецепторов» Стефенсона [11], согласно которой максимальный эффект агонистов наблюдается при оккупации части рецепторов. Рассуждения, приведенные выше, дают обоснование теории Стефенсона, исходя из современных представлений о молекулярных механизмах проведения и усиления рецепторного сигнала.

Объяснение нестабильности эффектов сверхмалых доз

Основной проблемой, возникающей при изучении закономерностей действия сверхмалых доз БАВ и требующей своего объяснения, является нестабильность эффектов, невоспроизводимость результатов экспериментов со сверхмалыми дозами. С нашей точки зрения, их можно было бы объяснить исходя из следующих представлений.

Эффекты сверхмалых доз индуцируются связыванием единичных молекул лигандов с клеточными рецепторами. В этих условиях понятие «концентрация» лишено физического смысла, так как речь идет о случайном распределении единичных молекул в некотором объеме.

Кроме того, в условиях связывания единичных молекул лиганда с рецепторами лиганд-рецепторное взаимодействие описывается законом редких событий (Пуассона) с математическим ожиданием N (число лиганд-рецепторных комплексов) и среднеквадратичным отклонением \sqrt{N} [12]. Это означает, что наблюдаются случайные флуктуации числа связанных с рецепторами лигандов порядка $1/\sqrt{N}$. В этом случае принципиальным становится получение критерия, по которому можно было бы рассматривать данные флуктуации как случайные или неслучайные.

Флуктуации числа лиганд-рецепторных комплексов при действии сверхмалых доз были получены во многих экспериментах и суммированы в обзорах [2, 3]. При увеличении числа лиганд-рецепторных комплексов величина $1/\sqrt{N}$ убывает. При $N \geq 10\,000$ лиганд-рецепторное взаимодействие может быть описано исходя из закона действующих масс (дисперсия числа лиганд-рецепторных комплексов становится мала по сравнению с их математическим ожиданием).

По всей видимости, случайные флуктуации порядка $1/\sqrt{N}$ наблюдаются не только для системы «лиганд-рецептор», но и для систем проведения и усиления

рецепторного сигнала, что приводит к увеличению величины случайных флуктуаций. К примеру, если предположить, что в среднем связывается 10 лигандов с клеточными рецепторами, то число лиганд-рецепторных комплексов будет флуктуировать от 7 до 13. Если при этом каждый лиганд-рецепторный комплекс взаимодействует в среднем с 10 G-белками, то число активных G-белков будет флуктуировать от 49 до 169. Если каждый G-белок активирует в среднем 10 аденилатциклаз, то число аденилатциклаз будет флуктуировать от 343 до 2197. Если каждая аденилатциклаза синтезирует в среднем 100 молекул цАМФ, то число синтезированных молекул цАМФ будет флуктуировать от 30,9 тыс. до 241,7 тыс., т.е. измеряемая в одном и том же эксперименте концентрация цАМФ может отличаться примерно в 6 раз за счет случайных флуктуаций.

Таким образом, можно ожидать, что с развитием вероятностных представлений о механизмах лиганд-рецепторного взаимодействия будут получены новые данные для объяснения эффектов действия сверхмалых доз БАВ.

Механизм формирования «мертвой зоны»

Одной из необъясненных закономерностей эффектов действия сверхмалых доз является отсутствие биологического ответа в области 10^{-12} – 10^{-8} М [3], наблюдаемое практически во всех экспериментальных работах. При этом чаще всего кривые «доза–эффект» имеют полимодальный характер (рис. 1). С нашей точки зрения, объяснение этому феномену может быть дано исходя из предположения о существовании систем с отрицательной обратной связью, например с субстратным торможением. Для таких систем на кривых доза – эффект наблюдается максимум.

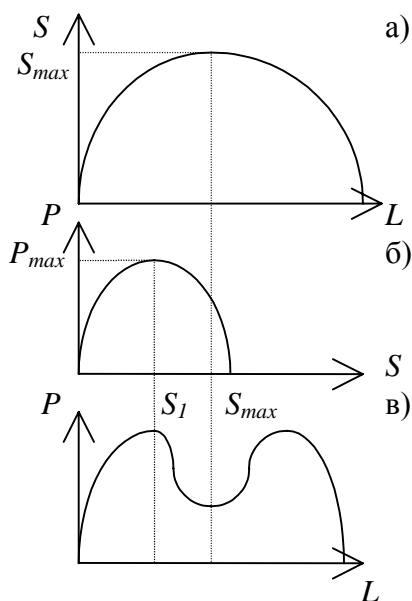
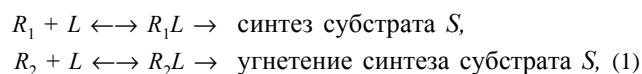


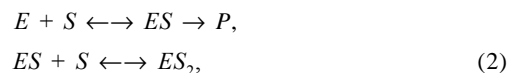
Рис. 2. Возможное объяснение формирования полимодальной зависимости «доза–эффект» (комментарии в тексте)

На рис. 2, а приведена кривая «доза–эффект» для схемы:



где R_1, R_2 – высоко- и низко-аффинные рецепторы, L – лиганд, R_1L, R_2L – лиганд-рецепторные комплексы с соответствующими рецепторами.

На кривой «доза–эффект» для схемы (1) наблюдается максимум (рис. 2, а) с максимальным синтезом субстрата, $S_{\text{макс}}$. Субстрат S может вступать в процесс ферментативных превращений. При этом, если кинетическая схема ферментативного превращения описывается следующим образом (субстратное угнетение):



то кривая «доза–эффект» для схемы (2) будет иметь максимум (рис. 2, б). В схеме (2) E – фермент, ES, ES_2 – активные и неактивные фермент-субстратные комплексы, P – продукт.

Пусть максимальный синтез продукта, $P_{\text{макс}}$, наблюдается при концентрации субстрата S_1 . Если точка максимума кривой «доза–эффект» схемы (2) приходится на возрастающий участок схемы (1) ($S_2 < S_{\text{макс}}$), то суммарная кривая «доза–эффект» будет иметь полимодальный характер (рис. 2, в).

Если синтез субстрата S подчиняется схеме (1), то на основании уравнений кинетики лиганд-рецепторного взаимодействия [4] в условиях равновесия количество субстрата определяется по формуле

$$[S] = \alpha \frac{[R_{01}][L]}{[L] + Kd_1} - \beta \frac{[R_{02}][L]}{[L] + Kd_2}, \quad (3)$$

где $[R_{0i}]$ – начальные концентрации рецепторов, $[L]$ – концентрация лиганда ($[L] > [R_{0i}]$), Kd – константы диссоциации лигандов с рецепторами, α, β – коэффициенты, учитывающие вклад каждого из рецепторов в активацию или угнетение синтеза субстрата.

«Мертвой» зоне на суммарной кривой «доза–эффект» (рис. 2, в) соответствует точка максимума на кривой «доза–эффект» для уравнения (3) (рис. 2, а), которая наблюдается при концентрации лиганда, удовлетворяющей тождеству

$$\alpha[R_{01}]Kd_1([L] + Kd_2)^2 = \beta[R_{02}]Kd_2([L] + Kd_1)^2. \quad (4)$$

Если $\alpha \approx \beta, [R_{01}] \approx [R_{02}], Kd_1 \approx Kd_2$, то при концентрации лиганда

$$[L] \approx \sqrt{Kd_1 Kd_2} \quad (5)$$

наблюдается максимальный синтез субстрата, $S_{\text{макс}}$.

Поскольку «мертвая» зона находится в диапазоне концентраций 10^{-8} – 10^{-12} М, то, как следует из проведенных рассуждений и условия (5), константы диссоциации лигандов с рецепторами должны иметь порядок 10^{-8} – 10^{-12} М,

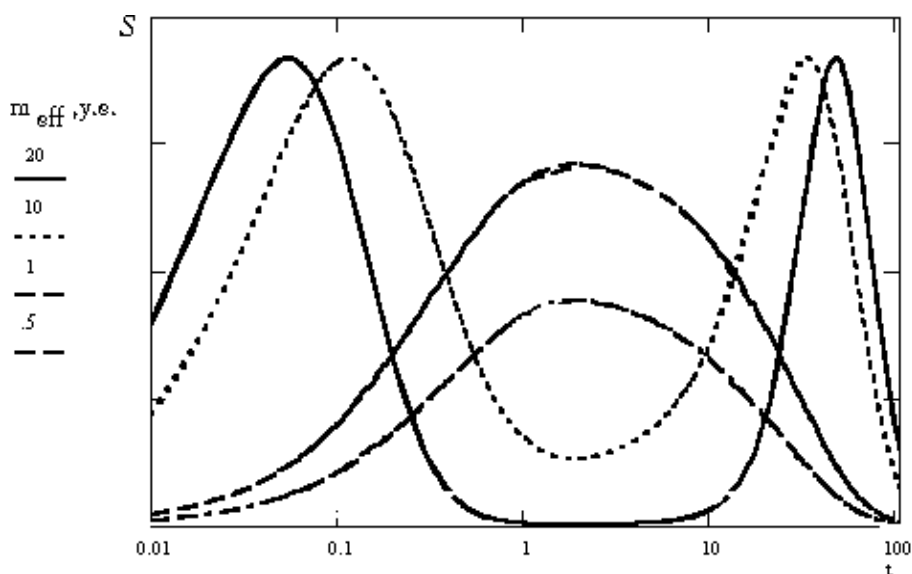


Рис. 3. Развитие дозозависимых эффектов с течением времени ($k_{эл} = 1$, $k_1 = 2$)

что действительно наблюдается для реальных рецепторных систем [4].

Развитие эффектов сверхмалых доз во времени

Системы с обратной связью позволяют сделать еще один очень интересный вывод. Пусть синтез субстрата S определяется схемой (1) и формулой (3) при $\alpha = \beta$, а концентрация лиганда изменяется в соответствии с кинетикой однокамерной фармакокинетической модели [4]

$$[L] = \frac{m_{эф}}{V} \left(e^{-k_{эл}t} - e^{-k_1t} \right),$$

где $m_{эф}$ – эффективная доза БАВ (поступающая в камеру), V – объем камеры, $k_{эл}$ – константа элиминации, k_1 – константа скорости поступления БАВ в камеру.

На основании вышеизложенных предположений можно построить моно- или бимодальные временные зависимости «доза–эффект» (рис. 3), причем число мод (максимумов на кривой) определяется эффективной дозой вве-

денного БАВ. При этом наблюдается смещение по времени максимума синтеза субстрата на бифазной кривой «доза–эффект», зависящее от эффективной дозы.

Поэтому в фармакологическом эксперименте необходима регистрация биологических эффектов в максимально возможном временном диапазоне (отсутствие снижения эффекта к моменту времени t_1 и отсутствие эффекта в момент времени $t_1 + d$ ($d > 0$) не означает отсутствия эффекта в момент времени t_2 ($t_2 > t_1 + d$)).

Для объяснения эффектов сверхмалых доз БАВ нет необходимости вводить понятия супервысокоаффинных рецепторов [2] или «адаптации» рецепторов [3], тем более что наличие супервысокоаффинных рецепторов и процессов рецепторной «адаптации» не доказано.

Эффекты сверхмалых доз, в том числе полимодальные, могут быть объяснены на основании представлений о существовании высокоэффективных систем проведения и усиления рецепторного сигнала с отрицательной обратной связью в одной или нескольких каскадных реакциях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sergeeva M.G., Gonchar M.V., Chistyakov V.V., Mevkh A.T. // Appl. Biochem. Biotech. 1996. **61**. P. 167.
2. Бурлакова Е.Б., Кондратов А.А., Худяков И.В. // Известия АН СССР. Сер. Биол. 1990. № 2. С. 184.
3. Сазанов Л.А., Зайцев С.В. // Биохимия. 1992. **57**. С. 1443.
4. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика. Практический курс. М., 1999.
5. Рыхлецкая О.С., Шангин-Березовский Г.Н. / Химический мутагенез в создании сортов с новыми свойствами. М., 1986. С. 210.
6. Шангин-Березовский Г.Н., Молоскин С.А., Рыхлецкая О.С. / Химический мутагенез в создании сортов с новыми свойствами. М., С. 243.
7. Подколотин А.А., Донцов В.И. Факторы малой интенсивности в биоактивации и иммуннокоррекции. М., 1995.
8. Gilles R., Gilles S., Jaenicke L. // Z. Naturforsch. 1984. **39**. P. 584.
9. Sergeeva M.G., Gonchar M.V., Mevkh A.T., Varfolomeev S.D. // FEBS Lett. **418**. P. 235.
10. Албертус Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. М., 1994.
11. Stephenson R.P. // Brit. J. Pharmacol. Chemother. 1956. **11**. P. 379.
12. Гуревич К.Г., Варфоломеев С.Д. // Биохимия. 1999. **64**. С. 83.