

Количественный подход к определению понятия «сверхмалые дозы лекарственных веществ и ядов»

Ф. С. Духович, Е. Н. Горбатова, В. К. Курочкин, В. А. Петрунин

ФЕЛИКС СЕРГЕЕВИЧ ДУХОВИЧ — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Государственного научно-исследовательского института органической химии и технологии (ГУП ГосНИИОХТ). Область научных интересов: механизмы связывания лекарств с рецепторами.

ЕЛЕНА НИКОЛАЕВНА ГОРБАТОВА — доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник ГУП ГосНИИОХТ. Область научных интересов: скрининг биологически активных веществ.

ВЛАДИМИР КОНСТАНТИНОВИЧ КУРОЧКИН — доктор химических наук, профессор, заместитель директора ГУП ГосНИИОХТ. Область научных интересов: строение лекарственных веществ, закономерности структура-активность.

ВИКТОР АЛЕКСЕЕВИЧ ПЕТРУНИН — доктор химических наук, профессор, директор ГУП ГосНИИОХТ. Область научных интересов: физическая химия биологически активных веществ.

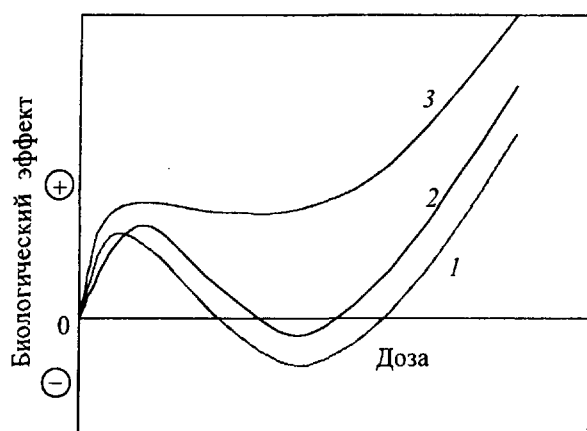
111024 Москва, шоссе Энтузиастов, 23, ГУП ГосНИИОХТ, факс (095) 273-34-40.

В последнее десятилетие опубликовано большое количество экспериментальных данных, свидетельствующих о значительных эффектах очень низких концентраций (доз) биологически активных веществ 10^{-12} — 10^{-17} М (10^{-7} — 10^{-12} мг/кг) и ниже. Отмечено влияние таких сверхмалых концентраций (сверхмалых доз, СМД) на всех уровнях биологической организации — от макромолекул до животных и растительных организмов [1—6]. Попытки объяснения природы эффектов СМД находятся пока на уровне гипотез.

Для эффектов СМД характерны необычные концентрационные зависимости (см. рисунок): при переходе от обычных концентраций к сверхмалым для некоторых веществ обнаруживается «мертвая зона», в которой эффект вещества не проявляется (кривая 1), в большом интервале СМД эффект может не зависеть от концентрации (кривая 2), может меняться знак эффекта «стимуляция-ингибирование» или наоборот (кривая 3).

Далеко не каждое вещество биологически активно в СМД. Часто действие СМД проявляется опосредованно через влияние на эффекты других веществ [3].

Так, нами обнаружено, что фенозан, обладающий



Типы зависимости «доза—эффект» для сверхмалых доз [3].
(Пояснения см. в тексте)

антиоксидантными свойствами, в концентрации 10^{-15} М (концентрация в организме животных введенного препарата) снижает продолжительность сна у крыс, вызванного гексеналом в обычных дозах [5]*.

Эффекты СМД в силу своих особенностей составляют особую область. В связи с этим возникает необходимость в более четком определении термина «сверхмалые дозы».

Нижняя граница эффективной дозы вещества, действующего по обычным механизмам рецепции, лимитируется минимальным количеством молекулярных биомишеней (рецепторы, ионные каналы, ферменты), подлежащих связыванию веществом. При этом занятость специфических рецепторов составляет существенную долю от общего их числа.

В табл. 1 приведены данные о количестве молекулярных мишеней в тканях человека и животных, которое определено по связыванию с ^3H -лигандами.

Из таблицы видно, что концентрации различных рецепторов в однотипных тканях не очень сильно различаются между собой для каждого биологического вида (значения в пределах одного порядка).

В наиболее богатых рецепторами тканях, например в коре головного мозга, их концентрация имеет порядок 10^{-8} М. Вместе с тем распределение рецепторов по тканям неравномерно. В мозжечке и белом веществе мозга концентрация рецепторов намного ниже, чем в коре головного мозга. Отмеченные в таблице рецепторы содержатся также в гладких мышцах, но отсутствуют в поперечнополосатых. В указанных количествах рецепторов, определенных с помощью меченых лигандов, некоторую часть составляют резервные (неактивные) рецепторы. Можно считать, что средняя концентрация приведенных в табл. 1 рецепторов в центральной нервной системе и, по-видимому, в целом организме имеет порядок 10^{-9} М.

* Для наших работ фенозан был любезно предоставлен профессором Е.Б. Бурлаковой.

Содержание молекулярных биомишеней в тканях человека и животных

Биомишень	Вид млекопитающего	Ткань	Концентрация биомишеней	
			10 ⁻¹⁵ моль / мг белка	10 ⁻¹² моль / г ткани *
М-холинорецепторы	Человек	Кора головного мозга	560 [7]	45
		Собака	Кора головного мозга	200 [8]
	Крыса	Кора мозжечка	36 [8]	2,9
		Белое вещество мозга	18 [8]	1,4
		Гомогенат мозга	900 [9]	72
		Сердце	150 [10]	30
Опиатные рецепторы	Человек	Префронтальная кора	—	42 (μ) ** [11]
	Крыса	Фронтальная кора	—	11,5 (μ) [12]
		Мозжечок	—	0,7 (μ) [12]
Рецепторы дофамина	Бык	Полосатое тело головного мозга	450 [13]	36
Рецепторы адреналина	Крыса	Головной мозг	55 (α)**; 64 (β)** [14]	9,5
		Мозжечок	60 [14]	4,8
Рецепторы серотонина	Человек	Мембраны коры мозга	320 [15]	26
	Крыса	Мембраны коры мозга	240 [16]	19
Na ⁺ -каналы	Кролик	Нерв	—	110 [17]
	Крыса	Мышца (диафрагма)	—	24,5 [17]

* Пересчет данных, приведенных в предпоследнем столбце, сделан исходя из содержания в 1 г мозговой и мышечной ткани 80 и 200 мг белка соответственно. ** α, β, μ — обозначение подтипов рецепторов.

Таблица 2

Вещества с высокой физиологической активностью

Вещество	Характер физиологического действия	Основная биомишень	Вид млекопитающего	Показатели активности	
				категория дозы и способ введения*	действующая доза, мг/кг
Зарин	Смертельный яд	Ацетилхолинэстераза	Человек	LD ₁₀₀ , в/м	0,03 [18]
				Токсическая доза, в/в	0,002 [19]
Зоман	Смертельный яд	Ацетилхолинэстераза	Мышь	LD ₅₀ , в/бр	0,45 [18]
				Кошка	LD ₅₀ , в/в
Батрахотоксин	Смертельный яд	Na ⁺ -каналы	Мышь	LD ₅₀ , в/м	0,005 [21]
ЛСД	Галлюциноген	Рецепторы серотонина	Человек	ED ₁₀₀ , внутрь	0,002 [22]
Производное нафтоксазина	Вызывает сильную рвоту	Рецепторы дофамина	Собака	ED ₅₀ , в/м	0,00005 [23,24]
Карфентанил	Анальгетик	Опиатные рецепторы	Крыса	ED ₅₀ , в/в	0,0006 [25]
Карбахолин	Лекарство для повышения тонуса мочевого пузыря и кишечника	М-холинорецепторы	Человек	Лекарственная доза**, в/в	0,0007 [26]
Атропин	Лекарство при язвенной болезни желудка и при бронхиальной астме	М-холинорецепторы	Человек	Лекарственная доза, в/м	0,0035—0,007 [26]
Лизурид	Лекарство для профилактики и лечения мигрени	Рецепторы серотонина	Человек	Лекарственная доза, внутрь	0,00036 [26]
Клофелин	Гипотензивное средство	Рецепторы адреналина	Человек	Лекарственная доза, внутрь	0,001 [26]
Гинипрал	Лекарство, токолитик	Рецепторы адреналина	Человек	Лекарственная доза, в/в	0,00007—0,00014 [26]

* в/м — внутримышечно, в/в — внутривенно, в/бр — внутрибрюшинно. ** Лекарственные дозы, приведенные в [13], пересчитаны в мг/кг на средний вес человека (70 кг).

В табл. 2 приведены действующие дозы наиболее токсичных ядов непептидной структуры и наиболее активных лекарственных веществ, молекулярная масса которых не превышает 700. Вещества, приведенные в табл. 2, можно разделить по физиологическому действию на три группы: первая — смертельные яды, нижний предел летальных доз 10^{-3} — 10^{-2} мг/кг соответствует средней молярной концентрации в организме 10^{-9} — 10^{-8} *M*, вторая — токсиканты несмертельного действия, вызывающие физиологические эффекты в дозах $5 \cdot 10^{-5}$ — 10^{-3} мг/кг и выше (10^{-10} — 10^{-9} *M*), третья группа — лекарственные вещества, эффективные в дозах 10^{-4} — 10^{-3} мг/кг, а некоторые даже в дозах порядка 10^{-5} мг/кг.

Сопоставление данных табл. 1 и 2 позволяет сравнить эффективные концентрации веществ с концентрацией биомишеней.

Сходство в концентрации различных рецепторов отражается в близости величин предельной активности веществ, действующих на разные рецепторы. Несколько более высокие дозы ядов обусловлены увеличением степени блокады мишеней. Вещества, действующие в концентрациях 10^{-9} — 10^{-10} *M*, обладают высоким сродством по отношению к специфическим мишеням. В этих случаях равновесие $L + R \leftrightarrow LR$ (*L* — лиганд, *R* — рецептор) сильно смещено в сторону образования лиганд-рецепторного комплекса. Число молекул таких веществ, введенных в организм, сравнимо с количеством рецепторов, которое нужно связать, чтобы проявился физиологический эффект. В этом случае снижения действующей дозы нельзя достигнуть за счет увеличения аффинности вещества. Если считать, что пороговые физиологические эффекты возникают при занятости ~10% специфических рецепторов, то дозы порядка 10^{-5} — 10^{-4} мг/кг (концентрации порядка 10^{-10} *M*) являются нижней границей обычных для фармакологии доз.

Допустим вариант, когда физиологический ответ возможен при занятости 1% мишеней. Тогда действующая концентрация высокоактивных веществ может быть порядка 10^{-11} *M*. Концентрации ниже 10^{-11} *M* можно считать сверхмалыми, так как при этих концентрациях проявление физиологического эффекта не может быть объяснено в рамках известных рецепторных механизмов и требует привлечения новых представлений. Концентрация $1 \cdot 10^{-11}$ *M* является, с нашей точки зрения, абсолютной границей между обычными и сверхмалыми концентрациями. Однако вещество может иметь более высокую индивидуальную границу СМД, которая тем выше значения $1 \cdot 10^{-11}$ *M*, чем меньше сродство вещества к биомишеням.

Об изменении механизмов действия биологически активных веществ при переходе от обычных доз к сверхмалым свидетельствует результат расчета числа столкновений молекул вещества с каждым активным центром биомишени. Число столкновений *Z* можно оценить по уравнению Смолуховского:

$$Z = 4\pi D_{1,2} R_{1,2} n$$

где $D_{1,2}$ — сумма коэффициентов диффузии взаимодействующих частиц, в данном случае рецептора и вещества; $R_{1,2}$ — сумма радиусов активного центра и молекулы вещества; *n* — число молекул вещества в единице объема; индексы 1 и 2 относятся к мишени и веществу, соответственно.

Приведем пример расчета: $D_1 = 0$, величину D_2 для рассматриваемых веществ можно принять равной $6 \cdot 10^{-6}$ см²·с⁻¹ (коэффициент диффузии сахарозы в воде), $R_{1,2} = 1 \cdot 10^{-7}$ см. При концентрации вещества $1 \cdot 10^{-10}$ *M* число молекул в единице объема составит $n = 6 \cdot 10^{10}$ молекул·см⁻³, тогда *Z* равно 0,5 столкновениям в 1 с или 30 в 1 мин. Можно полагать, что при указанной концентрации скорость доставки вещества к мишеням не будет препятствием для развития физиологического эффекта. При концентрации вещества 10^{-15} *M* число *Z* равно $5 \cdot 10^{-6}$ столкновениям в 1 с или одному столкновению за 56 ч. Низкое значение *Z* свидетельствует о том, что обычные механизмы рецепции неприменимы для объяснения физиологических эффектов сверхмалых доз.

Последний результат расчетов, на первый взгляд, противоречит фактам об особой чувствительности рецепторных клеток обонятельной системы млекопитающих и, особенно, насекомых. Например, порог чувствительности к иону у человека и собаки составляет $5 \cdot 10^{-13}$ и $5 \cdot 10^{-17}$ моль/л воздуха, соответственно, а некоторые виды насекомых реагируют на феромоны при концентрации их в воздухе 10^{-18} *M* [27]. Однако отмеченное противоречие кажущееся. Система распознавания запахов у насекомых устроена таким образом, что поровые трубочки обонятельных сенсилл вступают в непосредственный контакт с мембраной чувствительных клеток, обеспечивая тем самым активный транспорт воздуха к хеморецепторным клеткам [27]. Таким образом, вероятность попадания молекул одоранта на рецепторы определяется коэффициентом диффузии вещества в воздухе, который на несколько порядков больше, чем коэффициент диффузии в водной среде.

Следует учесть еще одну причину, объясняющую высокую чувствительность насекомых к феромонам. Удалось установить, что у некоторых видов насекомых изменение импульсной активности обонятельной клетки происходит, когда на нее попадают даже единичные молекулы вещества [28]. В составе обонятельной системы человека также имеется подобное сенсорное устройство — вомероназальный орган.

Казалось бы, можно предположить, что сверхчувствительность обонятельных клеток носит исключительный характер и других подобных рецепторных клеток в организме нет. Это дало бы основание утверждать, что переход в область СМД сопровождается кардинальными изменениями механизма действия физиологически активных веществ. Однако тот факт, что природа может создавать рецепторные клетки, способные реагировать на одиночные молекулы низкоаффинных веществ, каковыми являются многие одоранты, не позволяет сделать такое утверждение в отношении всех веществ, способных вызывать эффекты сверхмалых доз.

Таким образом, активность известных лекарственных средств и ядов может быть объяснена с позиции обычной рецепции только для концентраций не ниже 10^{-11} *M*. Проявления биологических воздействий, обнаруженных для концентраций меньше 10^{-11} *M*, следует относить к эффектам сверхмалых доз, объяснение которых требует выдвижения новых механизмов.

Отсутствие удовлетворительного объяснения парадоксального явления — эффекта СМД говорит о недостаточности современных знаний в области механизмов действия физиологически активных веществ. В связи с этим наши представления о верхней границе

сверхмалых доз остаются одной из возможных версий, которые можно предложить в настоящее время.

Данная работа выполнена при поддержке Международного научно-технического центра в рамках проекта № 752.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Худяков И.В. Изв. АН СССР. Сер. биол., 1990, № 2, с. 184.
2. Abstr. Int. congress on ultra low doses. Biological and clinical applications on ultra low doses. September 20–22, 1990, Bordeaux. France.
3. Бурлакова Е.Б. Вест. РАН, 1994, т. 64, № 5, с. 425.
4. Сазанов Л.А., Зайцев С.В. Биохимия, 1992, т. 57, № 10, с. 1443.
5. Горбатова Е.Н., Духович Ф.С., Курочкин В.К. Тез. II Межд. симп. «Механизмы действия сверхмалых доз», Москва, 1995.
6. Haley R.W. e. a. JAMA, 1997, v. 277, p. 217.
7. Wastek G.I., Jamatuna H.I. Mol. Pharmacol., 1978, v. 14, № 5, p. 768.
8. Hiley C.R., Burgen A.S.V. J. Neurochem., 1974, v. 22, p. 159.
9. Jamatuna H.I., Snyder S.H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, p. 1725.
10. Шелковников С.А. В кн.: Итоги науки и техники, сер. фармакол. М.: ВИНТИ, 1991, т. 25, с. 4.
11. Titeler M., Lyon R.A., Kuhar M.J., Frost J.F. e. a. Eur. J. Pharmacol., 1989, v. 167, p. 221.
12. Leysen J.E., Gommeren W., Niemegeers C.J.E. Ibid., 1983, v. 87, № 2/3, p. 209.
13. Хухо Ф. Нейрохимия. М.: Мир, 1990, с. 281.
14. Tsuchihashi H., Nagatomo T.J. Pharmacobio - Dyn., 1989, v. 12, № 3, p. 170.
15. Shiu J.C., Chend S.H. In: Psychopharmacology and Biochemistry of Neurotransmitter Receptors. N.-Y., 1980, p. 339.
16. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л. В кн.: Рецепторы. М.: Медицина, 1987, с. 194.
17. Ritchie J.M., Rogart R.B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 211.
18. Grob D., Harvey J. Clin. Invest., 1958, v. 37, p. 350.
19. Прозоровский В.Б., Саватеев И.В. Неантхолинэстеразные механизмы действия антихолинэстеразных средств. Л.: Медицина, 1976, с. 32.
20. Сильнодействующие ядовитые вещества и защита от них. М.: Воениздат, 1989, с. 89.
21. Химический энциклопедический словарь. М.: Советская энциклопедия, 1983, с. 727.
22. Руководство по токсикологии. Под ред. С. Н. Голикова. М.: Медицина, 1972, с. 318.
23. Martin G.E., Williams M., Pettibone D.J. e. a. J. Pharmacol. and Exp. Ther., 1985, v. 233, № 2, p. 395.
24. Martin G.E., Williams M., Pettibone D.J. e. a. Ibid., 1984, v. 230, № 3, p. 569.
25. Leysen J.E., Laduron P.M. Arch. Int. Pharmacol., 1978, v. 232, p. 343.
26. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Медицина, 1993, ч. I, 685 с.
27. Елизаров Ю.А. Хеморецепция насекомых. М.: изд-во МГУ, 1978, с. 81, 46.
28. Kaissling K.E., Priesner E. Naturwissenschaften, 1970, v. 57, p. 23.

УДК 577.3

Понятие конструкции в биологической физике. К вопросу о механизме действия сверхмалых доз

Л. А. Блюменфельд

ЛЕВ АЛЕКСАНДРОВИЧ БЛЮМЕНФЕЛЬД — доктор химических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАЕН, руководитель группы в Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (ИБХФ РАН), профессор Физического факультета МГУ им М. В. Ломоносова. Область научных интересов: биофизика внутриклеточных процессов, статистическая термодинамика.

117334 Москва, ул. Косыгина 4, ИБХФ РАН, тел. (095) 939-74-42, факс (095) 137-41-01,
E-mail blum@biolab.phys.msu.su

В последние годы в мировой научной литературе все чаще появляются работы, свидетельствующие о поразительных эффектах воздействия сверхмалых доз биологически активных веществ на протекание процессов в биологических объектах на молекулярном, субклеточном, клеточном уровнях и на уровне всего организма [1-6]. Подробный анализ этих и других публикаций можно найти в [7]. Основной парадоксальный результат исследования действия сверхнизких концентраций биологически активных веществ можно сформулировать следующим образом. Активность веществ в области обычных молярных концентраций ($10^{-7} M$ и выше) меняется с изменением концентрации в полном соответствии с законами классической химии. При концентрациях $10^{-7} - 10^{-17} M$ наблюдаются резкие отклонения от формального закона действующих масс, обнаруживаются максимумы активности при сверхнизких концентрациях.

При изучении взаимодействий в биологических системах следует иметь в виду, что в большинстве био-

химических и биофизических процессов определяющую роль играют биомакромолекулы, рецепторные участки мембран и аналогичные образования, являющиеся по существу молекулярными машинами, т.е. конструкциями с одной или несколькими выделенными степенями свободы.

Целью настоящей статьи является анализ свойств и поведения молекулярных конструкций в биологических системах и их возможной роли в эффектах сверхслабых воздействий.

Понятие конструкции в термодинамике и статистической физике биологических систем

При описании поведения природных объектов обычно вполне достаточно пользоваться стандартными характеристиками (термодинамическими параметрами и функциями). Для химических процессов, как правило, выбирают параметры: температуру T , давление p , объем V , химический состав (число молей n_1, n_2, \dots, n_i).