

Фармакокинетический анализ бимодальных дозозависимостей

К.Г. Гуревич

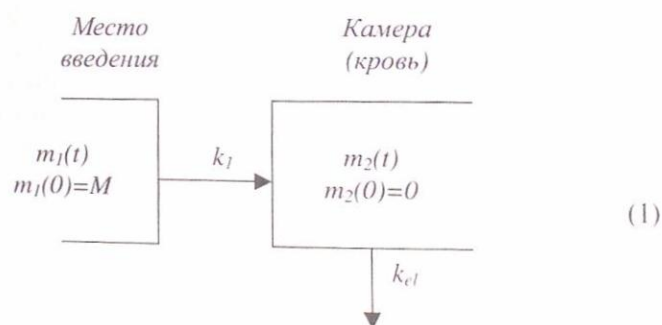
Кафедра ЮНЕСКО при МГМСУ «Здоровый образ жизни — залог успешного развития», г. Москва

В работе исследованы фармакокинетические эффекты, наблюдающиеся при наличии бимодальной зависимости доза-эффект. Показано, что наличие и отсутствие бимодальных дозовых эффектов определяется свойствами систем проведения и усиления биологического сигнала, а также концентрацией биологически активного вещества и его связыванием с белками крови. Бимодальные дозовые зависимости могут наблюдаться только для тех систем проведения и усиления сигнала, у которых есть отрицательная обратная связь: торможение избытком субстрата или продукта и т.д. Изменение степени связывания биологически активного вещества с белками крови и/или его концентрации в крови может привести к драматическому изменению формы биологического ответа: от бимодального к мономодальному и наоборот.

В фармакологии принято считать, что биологический ответ пропорционален силе воздействия на систему, при этом при воздействии чрезмерной силы возможно угнетение ответа из-за истощения «внутреннего резерва» клеток [1]. Однако в последние годы при изучении эффектов большого числа биологически активных веществ было показано, что дозовая зависимость имеет более сложный характер: в ответ на воздействия малой силы наблюдается клеточный ответ, на воздействия средней силы ответ отсутствует, на более интенсивные вновь проявляется (рис. 1). Дозовые зависимости такого типа называют бимодальными или, если максимумов более чем два, — полимодальными. Бимодальные дозовые кривые описаны для большого числа биологически активных веществ (см. таблицу), а также для действия ионизирующей радиации [2, 3].

При всем разнообразии химической природы веществ, имеющих бимодальные эффекты, при различии этих эффектов у них 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, то есть, это вещества, имеющие регуляторную природу. Исходя из такого заключения, ранее мы предложили возможный механизм формирования бимодальных дозовых зависимостей [4], основанный на свойствах систем каскадного проведения и усиления рецепторного сигнала в предположении, что некоторые из каскадных реакций имеют системы обратной связи (субстратное торможение, ингибирование избытком продукта и т.д.). В настоящей статье мы проводим фармакокинетический анализ развития биологического ответа для бимодальных дозовых зависимостей.

В живых системах биологический ответ определяется связыванием клеточных рецепторов с эндо- или экзогенными лигандами [5, 6]. В большинстве случаев эти лиганды не вырабатываются и не вводятся непосредственно в месте действия, а транспортируются по системе крови, лимфатической, межтканевой жидкости и т.д. Такому транспорту в простейшем случае отвечает линейная фармакокинетическая модель.



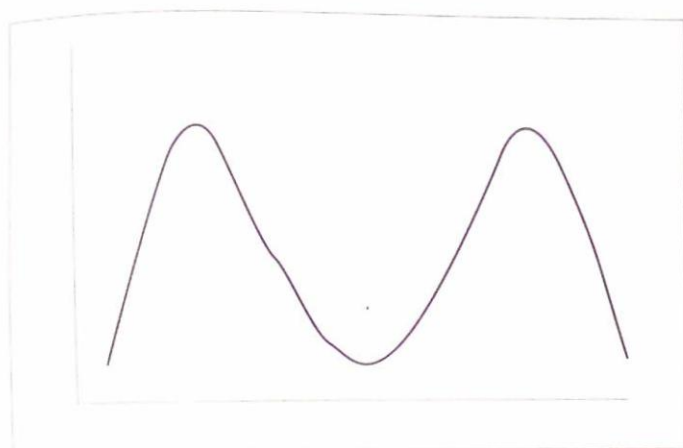
Где m_i — масса лиганда в камерах, k_1 , k_{el} — константы поступления и элиминации лиганда в кровь и из крови.

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



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

Бимодальная зависимость «доза-эффект»



Обычно концентрация лиганда много меньше концентрации связывающего белка. Так, например, концентрация альбуминов составляет порядка 10^{-5} М, при этом концентрация гормона роста, фактора роста нервов — 10^{-9} – 10^{-11} М [7]. Поэтому концентрацию белка-переносчика можно считать неизменной вследствие взаимодействия, описываемого схемой (2). Тогда концентрация комплексов лиганда с транспортными белками описывает следующее уравнение (аналог уравнения Кларка для рецепторного связывания):

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

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

Рис. 1

Для большинства лигандов $K \gg [L]$. Тогда (3) преобразуется так:

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

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

Тогда концентрация свободного лиганда определяется формулой:

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

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

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

$$\frac{dm_1}{dt} = -k_1 m_1, \quad m_1(0) = M \quad (6)$$

$$\frac{dm_2}{dt} = k_1 m_1 - \gamma k_{el} m_2, \quad m_2(0) = 0$$

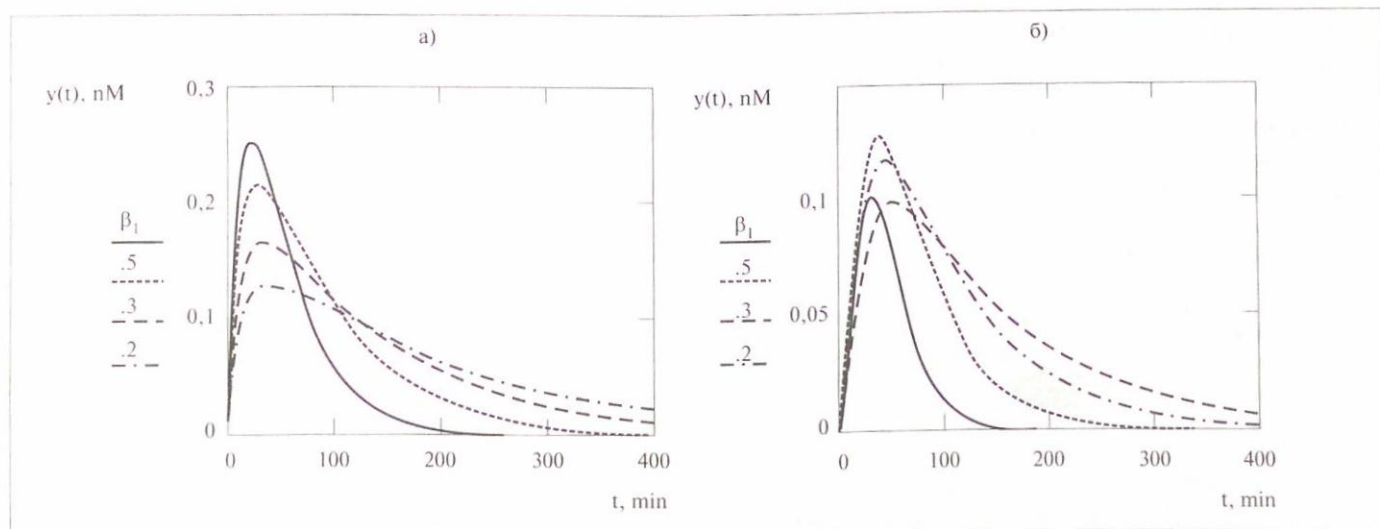
где γ — константа, учитывающая выведение только связанной формы лиганда (в этом случае $\gamma=\beta$, уравнение (5)) или только свободной формы лиганда (тогда $\gamma=\alpha$, уравнение (4)).

Для системы (6) решения записывается так:

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

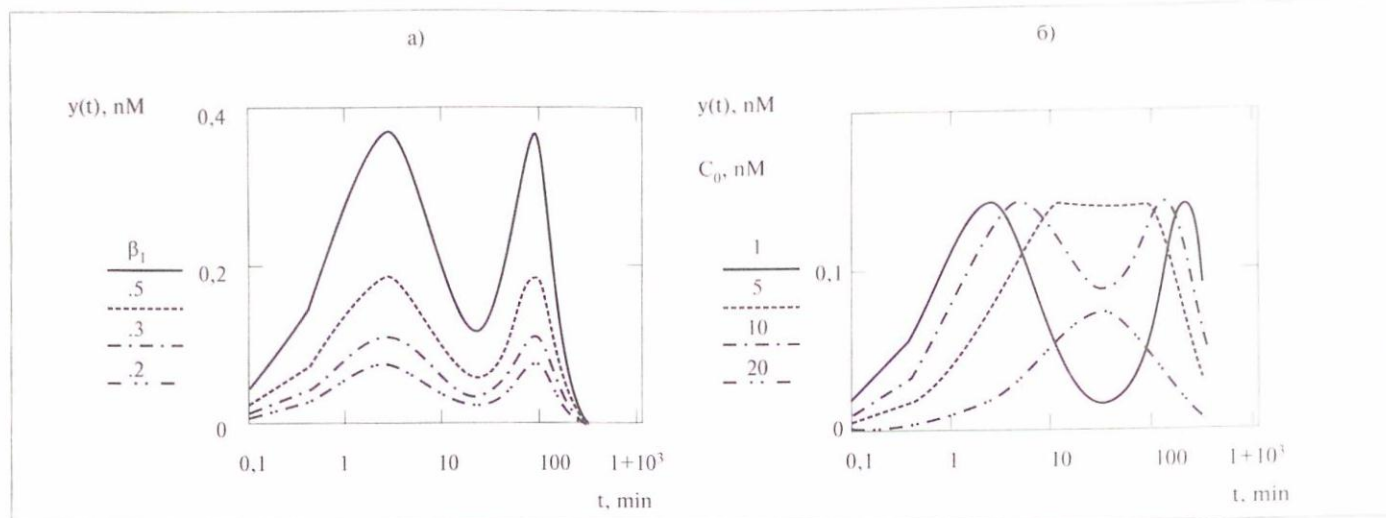
Рис. 2

Развитие биологического ответа во времени



Примечание. z определяется уравнением (12), y — уравнением (11) (а), (11') (б). $k_1 = 0,0277$ мин⁻¹, $k_{el} = 0,0714$ мин⁻¹, $C_0 = 1$ нМ, $A = 1$, $g = b$.

Развитие биологического ответа во времени



Примечание. z определяется уравнением (12), y — уравнением (13). $k_1 = 0,0277 \text{ мин}^{-1}$, $k_{el} = 0,0714 \text{ мин}^{-1}$, $A = 1$, $g = b$. а) $C_0 = 1 \text{ нМ}$, вариация b , б) $b = 0,388$, вариация C_0 .

Однако, с практической точки зрения, удобней использование концентрации, а не массы лиганда. Тогда (7) преобразуется:

$$C(t) = C_0 (e^{-k_{el}t} - e^{-k_1t}),$$

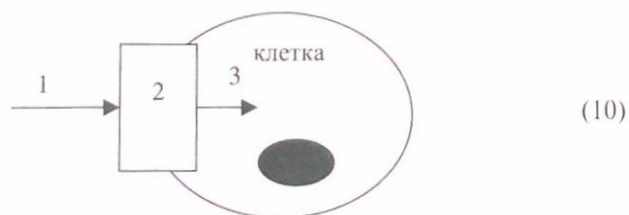
где $C(t) = m(t)/V$ — концентрация лиганда, V — объем камеры (для крови 5 л), C_0 — начальная эффективная концентрация лиганда.

Для того чтобы вызвать биологический ответ, лиганд должен провзаимодействовать с клеточным рецептором. Только свободная форма лиганда может это сделать:



где R — рецептор, LR — лиганд-рецепторный комплекс, K_d — константа диссоциации.

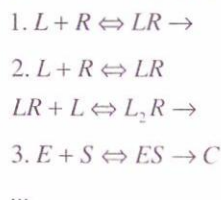
Концентрация лиганд-рецепторных комплексов зависит от соотношения концентраций лиганда и рецептора и модели рецепторного связывания [6]. Но нас интересует не количество связанного лиганда, а конечный клеточный ответ. Формирование этого ответа можно представить схемой:



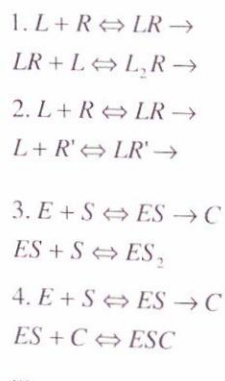
где 1 — поступающий сигнал (свободная концентрация лиганда), 2 — система проведения и усиления рецепторного сигнала, 3 — клеточный ответ.

Чтобы описать конечный клеточный ответ согласно схеме (10), мы провели классификацию основных моделей проведения и усиления сигнала. К схемам первого типа мы отнесли 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 (кроме схемы 2) с точностью до первых рядов

Таблица

Бимодальные зависимости доза-эффект

Соединение	Биологический ответ	Объект воздействия	Авторы
<i>Неорганические соединения</i>			
Ионы меди	термостабильность	клетки дуаниеллы	Веселова и соавт., 1993 [10]
	теплоустойчивость	мембраны тилакоиды	Веселовский и соавт., 1999 [11]
Ионы кальция	проницаемость	хлорные каналы	Kuruma, Hartzell, 2000 [12]
Пероксид водорода	повреждающая активность	клеточная линия V79	Kaneko et al., 1994 [13]
	повреждение ДНК	E. coli	Implay, Linn, 1986 [14]
<i>Пептидные органические соединения</i>			
200 токсинов	захват нейтрального красителя	фибробласты	Holzutter, Quedenau, 1995 [15]
Трициклические антидепрессанты	активность моноаминоксидазы	головной мозг, тромбоциты	Reid et al., 1988 [16]
Фенозан, α -токоферол	каталитическая активность	протсинкиназа С	Пальмина и соавт., 1999 [17]
Форболовый эфир	активация	В-клетки	Mond et al., 1991 [18]
Имазалил	рост клеток	семена гороха, водоросль сценелесмус	Веселовский и соавт., 1999 [11]
Органические пероксиды	рост биомассы	клетки культуры табака	Богатыренко и соавт., 1989 [19]
Форсколин	генерация активных форм кислорода	остеокласты	Berger, Datta, 2000 [20]
Простангландин E_2	пролиферация	лимфоциты	Sergeeva et al., 1997 [21]
Никотин	тревога	крысы	File et al., 1998 [22]
Трансформированный ростовой фактор β	секреция инсулина	клеточная линия MIN6	Sekine et al., 1994 [23]
Фактор роста опухолей β	пролиферация	культура гладко-мышечных клеток	Battegay et al., 1990 [24]
β -блокаторы	частота, сила сокращений	культура кардиомиоцитов	Moins et al., 1991 [25]
β -субъединица холерного токсина	рост	культура клеток 3T3	Buckley et al., 1990 [26]
Маленовый ангидрид	цитотоксичность	НК-клетки	Piccoli et al., 1984 [27]
<i>Пептидные соединения</i>			
трансглутаминаза	сродство адренорецепторов к лигандам	нейробластома	Zhang et al., 1999 [28]
нейропептид Y	пищевая мотивация	крыса	Borisova et al., 1991 [29]
опиоидные пептиды	высвобождение энкефалинов	бледное тело	Olive, Maidment, 1998 [30]
	активность аденилатциклазы	myenteric plexus	Wang, Gintzler, 1994 [31]
мет-энкефалин	пролиферация	лимфоциты	Дубинин, 1997 [32]
интерлейкин-1	активность цитохрома P450	гепатоциты	Nikolova-Karakashian et al, 1997 [33]
	стимуляция	б-клетки	Spinass et al., 1988 [34]
ростовой гормон	секреция и клиренс	человек	Veldhuis et al., 1993 [7]
п-формил-метионил-лейцин-фенилаланин	Продукция свободных форм кислорода	нейтрофилы	Bellavite et al., 1993 [35]

разложения в ряд Тейлора клеточный ответ так зависит от поступающего сигнала:

$$y = \frac{Az}{1+z} \quad (11)$$

и для схемы 2

$$y = \frac{Az^2}{1+z^2} \quad (11')$$

где z — поступающий сигнал (например, концентрация лиганда), y — клеточный ответ, 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 z описывается формулой:

$$z(t) = L(t) = \beta C_0 (e^{-k_{el}t} - e^{-k_1t}). \quad (12)$$

Нами был произведен численный расчет развития клеточного ответа во времени для схем первого типа (рис. 2). Величины k_{el} и k_1 были взяты из работы [7] для гормона роста. Как следует из рисунка, для схем первого типа наблюдается мономодальная дозовая фармакокинетическая зависимость, 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 [7], в которой изучались эффекты гормона роста и его аналогов при введении людям разных возрастных категорий, при ассоциации с различными белками-переносчиками, использовании разных доз гормона.

Для схем второго типа величину y можно описать уравнением:

$$y = Aze^{-\lambda t} \quad (13)$$

В этом случае фармакокинетическая дозовая зависимость имеет два максимума (бимодальная кривая), при этом величины максимумов и наличие бимодального эффекта зависят от введенной концентрации лиганда и его ассоциации с белками-переносчиками, что соответствует результатам работы (Veldhuis *et al.*, 1993). Незначительные изменения в этих величинах могут привести к драматическому изменению формы кривой ответа (рис. 3).

Обсуждение. Белковые транспортные системы млекопитающих характеризуются гетерогенностью связывающих белков [8]. Соответственно 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, а также и связыванием с белками-переносчиками. Концентрация лиганда и его связывание с транспортными системами определяют не только величину, но и форму биологического ответа, включая межпиковый период на бимодальной дозовой кривой и саму возможность формирования бимодального ответа. Изменение величин этих параметров может привести к драматической трансформации формы фармакокинетической кривой от мономодальной к бимодальной и наоборот.

Данное заключение имеет существенное значение для медицины. Это связано с тем, что достаточно часто в терапевтических целях используются синтетические аналоги гормонов (пероральная контрацепция, гормонзаместительная терапия и т.д.). Эти аналоги имеют другое сродство с транспортными белками крови, чем природные соединения. Таким образом, использование подобных препаратов может привести к извращению биологического ответа не только по величине, но и по форме. Поэтому назначение синтетических аналогов гормонов отнюдь не столь безопасно и безразлично для организма, как это может показаться на первый взгляд.

Кроме того, при многих патологических состояниях изменяется продукция гормонов, что наиболее характерно для новообразований из гормонпродуцирующих тканей. В частности, при поликистозе яичников описано изменение концентрации в крови половых гормонов; белка, связывающего половые гормоны, а также отношения концентраций свободных и связанных половых гормонов [9]. Как следует из наших результатов, это может привести к драматическому изменению 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. Такое исследование должно проводиться при достаточно широком диапазоне времен, чтобы быть уверенным в отсутствии (наличии) бимодальной дозовой зависимости. Кроме того, необходимо исследовать широкий диапазон концентраций исследуемого фармакологического препарата, так как увеличение/уменьшение дозировки может привести к изменению биологического ответа. Также обязательно следует исследовать зависимость биологического ответа от концентрации связывающих белков: у лиц разных возрастных категорий, при гипоальбумин- и глобулинемии, новообразованиях и т.д. Без подобных исследований нельзя быть уверенным в отсутствии изменения не только силы, но и формы биологического ответа у различных людей при широком использовании данного препарата.

Для лекарственных веществ, не имеющих регуляторного механизма (антибиотики), изменение дозировки и связывания с белками-переносчиками может повлиять на величину их максимальной концентрации и длительность циркуляции в крови (аналогично данным, приведенным на рис. 2). Несмотря на то, что при применении лекарственных веществ, не имеющих регуляторной природы, не происходит драматических изменений формы биологического ответа, их исследования также должны проводиться достаточно тщательно, учитывая возможные модификации в величине биологического ответа и частоте назначения препарата при изменении дозировки и/или связывании с белками крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галактионов С.Г., Голубович В.П., Шендерович М.Д., Архив А.А. Введение в теорию рецепторов. — Минск: Наука и техника, 1986. — 199 с.
2. Булакова Е.Б. Эффект сверхмалых доз // Вестн. Росс. Акад. наук, 1994. Т. 64, № 5, с. 425-431.
3. Спитковский Д.М. Биологическое действие малых доз ионизирующей радиации // Радиобиология, 1992, т. 32, № 3, с. 382-399.
4. Гуревич К.Г., Шимановский Н.Л. Закономерности действия сверхмалых доз биологически активных веществ // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 2000, № 3, с. 45-48.
5. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И. Рецепторы физиологически активных веществ. — М.: Волгоград: Семь ветров, 1999. — 637 с.
6. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика. Практический курс. — М.: Фаир-пресс, 1999. — 720 с.
7. Veldhuis J.D., Johnson M.L., Faunt L.M., Mercado M., Baumann G. Influence of high affinity growth hormone binding protein on plasma profiles of free and bound GH and on the apparent half-life of GH // J. Clin. Invest., 1993, V. 91, P. 629-641.
8. Barnard R., Wolff R. Analysis and application of an equilibrium model for in vitro bioassay systems with three components: receptor, hormone and hormone-binding protein // J. Theor. Biol., 1998, V. 190, P. 333-339.

9. Hamilton-Fairley D., White D., Griffiths M., Anyaoku V., Koistinen R., Seppala M., Franks S. Diurnal variation of sex hormone binding globulin and insulin-like growth factor binding protein-1 in women with polycystic ovary syndrome // *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1995. V. 43. P. 159-165.
10. Веселова Т.В., Веселовский В.А., Чернавский Д.С. Стресс у растений. — М.: Изд-во МГУ, 1993. — 144 с.
11. Веселовский В.А., Веселова Т.В., Чернавский Д.С. Трехфазная (парадоксальная) дозовая зависимость реакции растительной клетки на факторы внешней среды // *Росс. хим. журн.*, 1999. T. XLIII. № 5, с. 49-54.
12. Kurama A., Hartzell H.C. Bimodal control of a Ca(2+)-activated Cl(-) channel by different Ca(2+) signals // *J. Gen. Physiol.*, 2000. V. 115. N. 1. P. 59-80.
13. Kaneko M., Kodama M., Inoue F. Bimodal pattern of killing of Chinese hamster V79 variant cells by hydrogen peroxide // *Free Radic. Res.*, 1994. V. 20. N. 4. P. 229-239.
14. Imlay J.A., Linn S. Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide // *J. Bacteriol.*, 1986. V. 166. N. 2. P. 519-527.
15. Holzhtuter H.G., Quedenau J. Mathematical modelling of cellular responses to external signals // *J. Biol. Systems*, 1995. V. 3. N. 1. P. 127-138.
16. Reid A.A., Hill J.L., Murphy D.L. Interaction of tricyclic antidepressant drugs with human and rat monoamine oxidase type B. Naunyl Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 1988. 338: 678-683.
17. Пальмина Н.П., Мальцева Е.Л., Пыльзрь Е.И., Буракова Е.Б. Модификация активности протеинкиназы С лигандами в сверхмалых концентрациях. Роль протеинкиназы С в процессах перекисного окисления // *Росс. хим. журн.*, 1999. T. XLIII. № 5, с. 55-62.
18. Mond J.J., Feuerstein N., June C.H., Balapure A.K., Glazer R.L., Witherspoon K., Brunswick M. Bimodal effect of phorbol ester on B cell activation. Implication for the role of protein kinase C. // *J. Biol. Chem.*, 1991. V. 266. N. 7. P. 4458-4463.
19. Бозатыренко Т.Н., Редкозубова Г.П., Кондратов А.А., Антоновский В.Л., Буракова Е.Б. Влияние органических пероксидов на рост культивируемых клеток высших растений // *Биофизика*, 1989. T. 34. № 2, с. 327-329.
20. Berger C.E., Datta H.K. Forskolin has a bimodal cAMP-independent effect on superoxide anion generation in isolated osteoclasts // *Exp. Physiol.*, 2000. V. 85. N. 1. P. 57-60.
21. Sergeeva M.G., Gonchar M.V., Mekh A.T., Varfolomeev S.D. Prostaglandin E₂ biphasic control of lymphocyte proliferation: inhibition by picomolar concentration // *FEBS Lett.*, 1997. V. 418. P. 235-238.
22. File S.E., Kenny P.J., Ouagazzal A.M. Bimodal modulation by nicotine of anxiety in the social interaction test: role of the dorsal hippocampus // *Behav. Neurosci.*, 1998. V. 112. N. 6. P. 1423-1429.
23. Sekine N., Yamashita N., Kojima I., Miyazaki J., Ogata E. Bimodal effect of transforming growth factor-beta on insulin secretion in MIN6 cells // *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 1994. V. 26. N. 1. P. 7-14.
24. Battegay E.J., Raines E.W., Seifert R.A., Bowen-Pope D.F., Ross R. TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop // *Cell*, 1990. V. 63. N. 3. P. 515-524.
25. Moins N., Renoux M., Boucher M., Gachon P. Paradoxal pharmacologic effects observed with beta-blocker agents on cardiac cells in culture // *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 1991. V. 27A. N. 2. P. 147-150.
26. Buckley N.E., Matyas G.R., Spiegel S. The bimodal growth response of Swiss 3T3 cells to the B subunit of cholera toxin is independent of the density of its receptor, ganglioside GM1 // *Exp. Cell Res.*, 1990. V. 189. N. 1. P. 13-21.
27. Piccoli M., Saito T., Chirigos M.A. Bimodal effects of MVE-2 on cytotoxic activity of natural killer cell and macrophage tumoricidal activities // *Int. J. Immunopharmacol.*, 1984. V. 6. N. 6. P. 569-576.
28. Zhang J., Tucholski J., Lesort M., Jope R.S., Johnson G.V. Novel bimodal effects of the G-protein tissue transglutaminase on adrenoceptor signalling // *Biochem. J.*, 1999. V. 343. Pt. 3. P. 541-549.
29. Borisova E.V., Kadar T., Telegdy G. Bimodal effect of neuropeptide Y on feeding, and its antagonism by receptor blocking agents in rats // *Acta Physiol. Hung.*, 1991. V. 78. N. 4. P. 301-308.
30. Olive M.F., Maidment N.T. Opioid regulation of pallidal enkephalin release: bimodal effects of locally administered mu and delta opioid agonists in freely moving rats // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1998. V. 285. N. 3. P. 1310-1316.
31. Wang L., Gintzler A.R. Bimodal opioid regulation of cyclic AMP formation: implications for positive and negative coupling of opiate receptors to adenylyl cyclase // *J. Neurochem.*, 1994. V. 63. N. 5. P. 1726-1730.
32. Дубинин К.В. Кинетические закономерности регуляции гуморального и клеточного иммунного ответа опиоидными рецепторами и их лигандами. Автореф. дисс. ... канд. хим. Наук. М., 1997. — 20 с.
33. Nikolova-Karakashian M., Morgan E.T., Alexander C., Liotta D.C., Merrill A.H. Jr. Bimodal regulation of ceramidase by interleukin-1beta. Implications for the regulation of cytochrome p450 2C11 // *J. Biol. Chem.*, 1997. V. 272. N. 30. P. 18718-18724.
34. Spinas G.A., Palmer J.P., Mandrup-Poulsen T., Andersen H., Nielsen J.H., Nerup J. The bimodal effect of interleukin 1 on rat pancreatic beta-cells—stimulation followed by inhibition—depends upon dose, duration of exposure, and ambient glucose concentration // *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, 1988. V. 119. N. 2. P. 307-311.
35. Bellavite P., Chirumbolo S., Lippi G., Guzzo P., Santonastaso C. Homologous priming in chemotactic peptide stimulated neutrophils // *Cell Biochem. Funct.*, 1993. V. 11. P. 93-100.