

Труды IV Международного конгресса "Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине - 2006"
При цитировании или перепечатывании ссылка обязательна.

Адрес этой статьи в интернете: www.biophys.ru/archive/congress2006/pro-p131.pdf

ДВА ПОЛЯРНЫХ ТИПА ОТВЕТА ЖИВОЙ СИСТЕМЫ НА СЛАБОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ – ДВА РЕДОКС СОСТОЯНИЯ – ДВЕ КОНФОРМАЦИИ МАКРОСТРУКТУРЫ БЕЛКА

В.В.Соколовский, Л.Н.Галль

г.Санкт-Петербург, Институт аналитического приборостроения РАН.

Существование феномена двух альтернативных один другому вариантов ответа живой системы на действие слабых агентов еще не пользуется должным вниманием в биологической литературе. Между тем, понимание природы этого явления, безусловно, обещает интересные перспективы в медикобиологическом плане.

Обсуждая эту тему, отдельные авторы отмечали важность исходного состояния системы для типа ее реакции на воздействие [И.М.Спектор, 1966; А.П.Дубров, 1980]. Причины изменений исходного состояния при этом связывали с биоритмами на уровне популяции [А.П.Дубров], с процессами «колебания биомолекул», перехода одного типа энергии в другой, резонансными эффектами взаимодействия [А.А.Подколзин и соав., 1994].

Современные сведения о механизмах редокс регуляции биосистем предоставляют новые возможности для интерпретации литературных данных и, в частности, - результатов некоторых работ по исследованию роли и свойств тиолдисульфидной системы, ранее выполненных на кафедре биохимии ЛСГМИ под руководством В.В.Соколовского [1979, 1982, 1984, 1986, 1996].

К настоящему времени мнение о ключевой роли тиолдисульфидной системы (ТДС) в редокс регуляции, высказанное еще в 70-х годах [В.В.Соколовский, 1979], полностью сформировалось [L.Packer, 1995; L.Moran et al., 2001; P.Ghezzi et al., 2005]. Одним из наиболее эффективных путей к этому заключению явилось изучение активности тиоловых ферментов, которое позволило с высокой достоверностью проследить влияние SH-групп на структуру белка и на тесно связанные с нею физико-химические и биологические свойства. Удачной моделью для оценки и демонстрации значения окислительно-восстановительных превращений ТДС в регуляции активности тиоловых ферментов оказалась, например, Na^+, K^+ - аденозинтрифосфатаза (АТФаза). В серии исследований активности Na^+, K^+ -АТФазы митохондрий нервных клеток головного мозга белых крыс, В.А.Кулеба и В.М.Тимофеева [1984] показали, что инкубация суспензии митохондрий в присутствии восстановителя (димеркаптопропансульфонат натрия – «унитиол») сопровождалась увеличением активности фермента на 74%, тогда как окислители вызывали уменьшение его активности. При этом в присутствии гидропероксида, вызывающего слабый окислительный стресс, активность АТФазы уменьшалась на 40%, но вновь полностью восстанавливалась унитиолом, а действие сильного окислителя (молекулярный йод) приводило к полному ее ингибированию (рис.1).

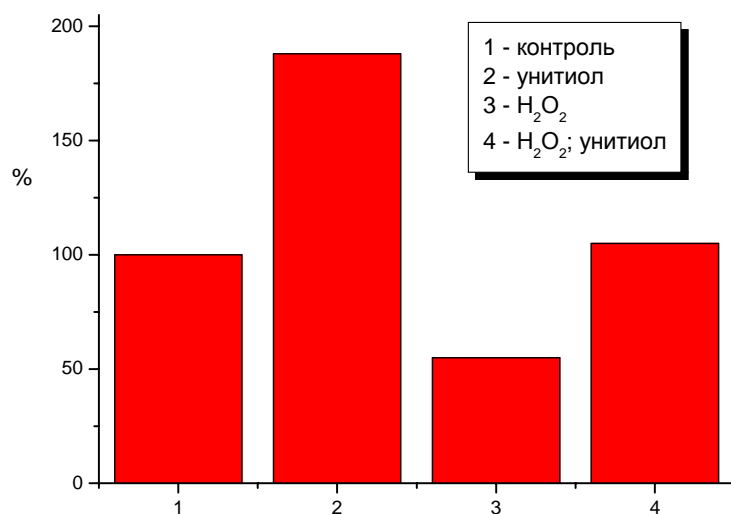


Рис.1. Активность Na⁺,K⁺-АТФазы нервной ткани белых крыс при изменениях редокс состояния тиолдисульфидной системы **1** – контроль; **2** – восстановитель (унитиол, 1 × 10⁻³М); **3** – окислитель (гидропероксид, 1 × 10⁻³М); **4** – окислитель и восстановитель.

Таким образом, имея в виду известные сведения о влиянии редокс состояния тиолдисульфидной системы на конформацию белков [Y.Gilbert,1995, L.Weiner, 1995], из приведенных на рис.1 данных можно заключить, что двум альтернативным редокс состояниям фермента – восстановления и окисления – соответствуют два конформационных состояния и два вида специфической активности – активации и торможения фермента. Эта возможность направленного изменения его активности сохраняется до тех пор, пока макроструктура белка остается нативной и сохраняет свою способность к обратимым превращениям ТДС и конформации. Переход ТДС в необратимое состояние при жестком окислении SH-групп белка (окисление иодом) сопровождается его денатурацией и потерей специфической активности.

Тот факт, что обратимые конформационные переходы, происходящие в пределах нативной макроструктуры белка при вариациях тиолдисульфидного отношения, сопровождаются одновременными радикальными изменениями специфической активности белка (или связанной с ним биологической функции) имеет фундаментальное значение.

В Таблице 1 приведены примеры антагонистических обратимых биологических эффектов, и являющихся альтернативными конформационными состояниями нативного белка и редокс состояния ТДС.

Таблица 1.

Биологический объект	Обратимый биологический эффект	
	Эффект 1	Эффект 2
1. Сократительный белок	Релаксация	Сокращение
2. Тиоловые ферменты	Активация	Ингибирование
3. Липопротеиды	Стабилизация	Дестабилизация
4. Клетки крови	Дезагрегация	Агрегация
5. Клеточные мембраны	Поляризация	Деполяризация
6. Нейрорецепторы	Возбуждение	Торможение
7. Митохондриальный фактор сопряжения окислительного фосфорилирования	Сопряжение	Разобщение

Непосредственное отношение к сказанному имеет также другая работа, выполненная на кафедре биохимии ЛСГМИ, связанная с изучением механизма гемолитического действия тиоловых ядов, в которой исследовалось влияние окисляющих веществ на прочность фиксации липидов в мембране эритроцитов [Т.Б.Лиэлуп и соав., 1979].

Известно, что в состав белков липопротеинового каркаса мембраны эритроцитов входят сульфгидрильные группы, являющиеся мишенями широкого круга химических веществ, представленных тиоловыми ядами. Результатом такого действия может, в частности, быть блокирование окисляющим агентом реакционно способных тиоловых групп апопротеиновой части липопротеидов, что приводит к дестабилизации и разрушению последних вследствие конформационных изменений апобелка, сопровождающихся ослаблением и разрывом связей «липид – белок». Возможность такого рода была показана на примере водорастворимых липопротеидов, экстрагированных из тканей печени и головного мозга животных [В.В.Соколовский и соав., 1973]. С полным правом сюда можно отнести давно описанный в литературе феномен появления капелек свободного жира («суданофильной субстанции») в ткани головного мозга при глубокой гипоксии, поскольку теперь известно, что при гипоксических состояниях происходит активация процессов свободнорадикального окисления. С помощью специально разработанных методических подходов прочность связывания липидов в мембранах эритроцитов в упомянутой выше работе оценивали путем определения количества холестерина и фосфолипидов, легко экстрагируемых из мембран до и после воздействия на клетки окислителей – нитрита натрия и молекулярного йода. Оба вещества использовались в концентрациях, которые в предварительных опытах позволили наблюдать одинаковый по силе эффект – отчетливое снижение осмотической резистентности эритроцитов, предшествующее гемолизу.

Результаты опытов при их статистической обработке не выявили достоверных различий между средними величинами, характеризующими количество «лабильного» холестерина в контроле и при действии нитрита натрия. Однако было обнаружено существование двух видов эффекта действия нитрита на ультраструктуру клеточной мембраны: в 47% случаев содержание лабильного холестерина уменьшалось в среднем на 9 мг %, тогда как в 53% случаев – увеличивалось на 7 мг % (при $p < 0,05$). В то же время содержание лабильных фосфолипидов в сравнении с контролем однозначно возросло на 35%. При действии более сильного окислителя – молекулярного йода – содержание лабильного холестерина во всех опытах возросло и в среднем составило 12 мг % (в сравнении с контролем); количество лабильных фосфолипидов увеличилось на 87%. В Таблице 2 приведены данные об изменениях содержания лабильного холестерина в мембране эритроцитов кролика, преикубированных с NaNO_2 или J_2 (в сопоставлении с контролем).

Таблица 2.

Окислитель	Кон-ция окислителя	Лабильный холестерин	Число случаев %	ρ
NaNO_2	$2 \times 10^{-3}\text{M}$	-9 мг % +7 мг %	47 53	< 0,05
J_2	$2 \times 10^{-4}\text{M}$	+12 мг %	100	< 0,05

Авторы констатируют способность окисляющих веществ уменьшать прочность фиксации липидов в мембране эритроцитов и связывают ее с конформационными изменениями белков липопротеинового каркаса мембраны, индуцированными окислительной модификацией их сульфгидрильных групп. Однако причины проявления двух противоположных по знаку эффектов действия нитрита на липопротеиновые комплексы мембраны остались вне обсуждения, ибо в 70-х годах им не было приемлемого толкования. Некоторым утешением в этом случае может служить лишь тот факт, что А.Л.Чижевский [1980], значительно ранее обнаруживший сходный эффект – увеличения и уменьшения скорости оседания эритроцитов (СОЭ) при действии на суспензию этих клеток слабого постоянного электрического поля; тоже не стал вдаваться в детали при описании этого парадокса, хотя и отметил при этом, что численное соотношение эффектов двух знаков было примерно 1:1. Тожественное найденному А.Л.Чижевским количественное распределение противоположных по знаку данных при исследовании влияния на СОЭ гидропероксида было недавно отмечено в нашей лаборатории Т.Ф.Федоровой [2004 г].

Таким образом, реальность существования этого явления не вызывает сомнений и ставит вопросы о его биологической природе и значении, имеющие, как представляется, отнюдь не узкий феноменологический интерес.

Представляется, что ключевую роль в решении данной задачи могут сыграть представления о макроструктуре живого белка и механизмах ее регуляции. Как полагает L.Weiner [1995], «одной из

наиболее важных проблем аналитической биохимии является состояние SH-групп в белках, интерес к изучению которого возрастает, поскольку установлено его существенное значение во многих случаях, связанных с конформационным состоянием и стабильностью белка».

В этой связи необходимо иметь в виду, что специфические функции белков (ферментативные и пр.) определяются не только особенностями химического строения полипептидной цепи, имеющей в каждом индивидуальном белке свою уникальную последовательность аминокислот, но и нативной макроструктурой – упорядоченной пространственной конфигурацией (конформацией) полипептидной цепи. Эти функции непосредственно зависят от определенных участков белковых молекул, где имеются комплексы пространственно организованных химических групп или специфически активные центры. Функциональные химические группы активного центра представлены, в основном, различными аминокислотными остатками [В.А.Белицер, 1962]. Поскольку теперь известно [J.Rahman et al., 2005], что многие белки содержат высоко реакционноспособные цистеиновые остатки, тиоловые фрагменты которых, локализованные в активных регуляторных центрах, являются первичными мишенями окислительных модификаций, они, таким образом, являются важными компонентами механизма редокс сигнализации. Изменения в количественном соотношении внутриклеточных восстановленных (SH) и окисленных (S-S) дисульфидных форм оказывают воздействие на пути сигнализации в различных физиологических реакциях – от клеточной пролиферации до генной экспрессии и апоптоза [J.Hancock et al., 2004]. Отметим, что модуляция специфической биологической активности белка рассматривается в последнее время как следствие конформационных изменений нативной макроструктуры белка, вызванных модификацией редокс состояния тиолдисульфидной системы [H.Gilbert, 1995; L.Weiner, 1995; J.Hancock et al., 2004; P.Ghezzi et al., 2005]. Это положение, принципиально важное для наших дальнейших рассуждений, нуждается в некоторых комментариях, касающихся нативной конформации белка.

В ряде случаев при определении разными авторами зависимости активности тиоловых ферментов от концентрации реагента, модифицирующего SH-группы, прослеживается общая закономерность: повышение активности фермента при низких концентрациях такого реагента и прогрессирующее снижение активности при увеличении концентрации.

Этот любопытный факт наводит на мысль о существовании двух альтернативных состояний макроструктуры фермента, обусловленных количеством и локализацией заблокированных SH-групп, и отзывающихся на его активности. Ранее, основываясь на других фактах, М.Г.Гольдфельд и соав. [1982] высказали предположение, что мембранная аденозинтрифосфатаза хлоропластов находится в двух конформационных состояниях, различающихся по характеру активности, отметив при этом, что переходы между этими состояниями могут быть вызваны редокс агентами.

Все это еще раз заставляет обратить внимание на тесную связь биологической активности белка с его конформационным состоянием, на подвижность и обратимость изменений нативной макроструктуры белков.

Зависимость конформации и специфической активности белка от редокс состояния и обратимость окисления тиолов в физиологических условиях, по существу, делают тиолы ключевым звеном механизма редокс регуляции клеточных функций. Обратимость окисления тиолов (циклические переходы между восстановленными SH-группами и окисленными -S-S- группами) означает, что белок, претерпев структурные изменения в процессе выполнения определенной функции, вновь возвращается в первоначальное, исходное состояние, что позволяет ему вновь реагировать на повторное воздействие. Многократное повторение цикла тиол-дисульфидных редокс превращений может рассматриваться как ритмический процесс. Любой ритмический процесс, как известно, «образует цепь переходов от одного крайнего состояния к другому и обратно». [В.П.Карп, А.П.Никитин, 2004].

Между тем, для ритмически колеблющейся биосистемы реакция на воздействия химических и физических факторов должна быть неодинаковой в различных точках периода биологического ритма [Ю.А.Романов и соав., 2004]. Величина реакции в зависимости от состояния активности белка во времени может повышаться, снижаться или не изменяться. Эта закономерность составляет содержание одного из принципов хронобиологических информационных взаимодействий в живой системе – принципа усиления, ослабления или инверсии информационного воздействия биологическим ритмом. Поскольку возникновение и исчезновение реакций носит ритмический характер, то это явление получило в хронобиологической литературе наименование «ритмов чувствительности» биологической системы к различного рода воздействиям [Ю.А.Романов, 2004].

Суточные ритмы чувствительности клеток к внешним воздействиям играют, например, важную роль в механизмах регуляции гомеостаза различных клеточных функций.

Возвратимся теперь к содержанию табл. 2. Тот факт, что в одной половине случаев действие слабого окислителя привело к увеличению выхода лабильного холестерина из состава липопротеиновых комплексов нервной ткани, а в другой половине случаев – к его уменьшению, позволяет говорить о дестабилизации связей «липид – белок» в первой группе данных и о возрастании их прочности – во второй. По всей вероятности, общей причиной этих двух антагонистических эффектов стали два альтернативные состояния конформации апопротеиновой части липопротеидов, обусловленные альтернативными редокс состояниями ТДС. Если это редокс состояние рассматривать в динамике его повторяющихся колебаний, т.е. как ритмический процесс, то можно думать, что мы имеем дело с двумя противоположными по характеру типами чувствительности колеблющейся системы к слабому воздействию. Поскольку отбор биологического материала и его анализ производились в одно и то же время суток, остается предположить, что синхронные проявления двух «зеркальных» вариантов чувствительности к действию одного агента в исследуемой группе животных обусловлены сосуществованием в популяции двух форм ритма колебаний (тиолдисульфидного отношения, конформации белков, биологического эффекта), находящихся в противофазе относительно друг друга (рис.2).

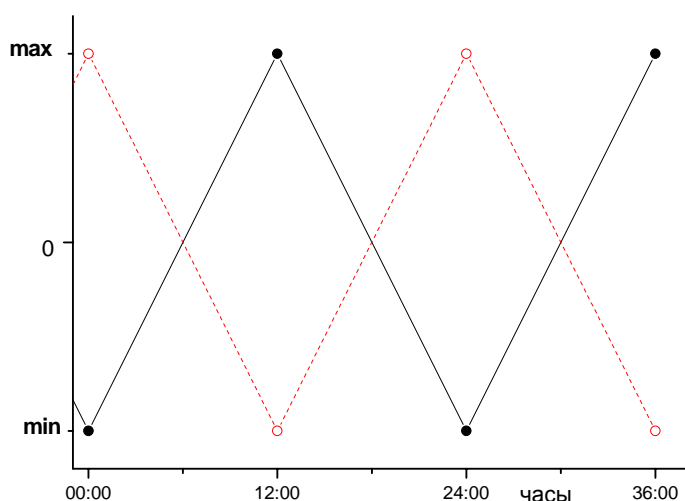


Рис.2.

человека, не приходится сомневаться, что это откроет перспективу идентификации индивидуального ритма чувствительности человека к действию химических и физических факторов, информация о котором необходима для ориентации врача в отношении тактики применения методов лечения в оптимальном интервале времени.

Заметим также, что изложенные представления позволяют видеть одну из важных причин развития десинхронозов и дезадаптации организма человека в модификации внешними факторами, - в том числе слабыми полями и излучениями, - редокс механизма биологической регуляции.

Литература:

1. Спектор И.М. – Влияние исходного состояния белка на направление и степень изменений под действием денатурирующего фактора. // Биофизика. 1966. – т. 11 – №3. – с. 406-411.
2. Дубров А.П. – Симметрия функциональных процессов. – «Знание». – М. – 1980. – Сер.биол., №8.
3. Подколзин А.А., Донцов В.И., Попонин В.П., Шепеленко А.М. – Физико – химические и биологические основы действия факторов малой интенсивности. // Успехи соврем. биол., 1994. – т. 114. – вып. 2. – с. 160-170.
4. Packer L. (ed.) – Methods in Enzymol. – vol. 251: Biothiols. – 1995. – Acad. Press. – San-Diego.–382p.
5. Moran L., Gutteridge J., Quinlan G. – Thiols in cellular redox signaling and control. // Curr. Med. Chem. – 2001. – v.8. – №7. – p. 763-773.

6. Ghezzi P., Bonetto V., Fratelli M. – Thiol – disulfide balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulation. // *Antioxid. a Redox Signal.* – 2005. – v.7 – №7-8. – p. 964-972.
7. Кулеба В.А., Тимофеева В.М. – Избирательная чувствительность АТФаз к изменениям окислительно – восстановительного состояния среды. // *Антиоксиданты и адаптация.* – Сб. науч. трудов, под ред. проф. В.В.Соколовского. – ЛСГМИ. – Л. – 1984. – с. 44-49.
8. Лиэлуп Т.Б., Новикова Е.Ф., Пожиленкова К.Ш. – Гемолитическое действие тиоловых ядов. I. Влияние окислителей на прочность фиксации липидов в мембране эритроцитов. // *Тиоловые соединения в биохимических механизмах патологических процессов.* – Сб. науч. тр. под ред. В.В.Соколовского. – ЛСГМИ. – Л. – 1979. – с. 18-21.
9. Соколовский В.В., Атянина Т.Ф., Сорокин А.И. – Об участии сульфгидрильных групп в конъюгировании белков с липидами. // *ДАН СССР.* – 1973. – т. 209. – №3.
10. Чижевский А.Л. – Биофизические механизмы реакции оседания эритроцитов. // *Наука.* – Новосибирск. – 1980. – 177с.
11. Weiner L. – Quantitative determination of thiol groups in low and high molecular weight compounds by electron paramagnetic resonance. // *Methods in enzymol.* – 1995. – v.251. – p.87-105.
12. Белицер В.А. – Макроструктура и денатурационные превращения белков. // *Укр. биохим. ж-л.* – 1962. – т. 34. – №2. – с. 290-320.
13. Rahman J., Biswas K., Jimenez L., Torres M., Forman H. – Glutathione, stress responses and redox signaling in lung inflammation. // *Antioxid. a Redox Signal.* – 2005. – v.7 – №1-2. – p. 42-59.
14. Hancock J., Desikan R., Neill S., Cross A. – New equation for redox and nano – signal transduction. // *J. Theor. Biol.*, 2004. – v. 226. – №1. – p. 65-68.
15. Gilbert H. – Thiol / disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability. // *Methods in enzymol.* – v. 251 (ed. L.Packer). Acad. Press. – San-Diego. – 1995. – p. 8-28.
16. Гольдфельд М.Г., Дмитровский Л.Г., Блюменфельд Л.А. – Влияние редокс – агентов и хелатов на свойства АТФазы хлоропластов. // *Молек. биол.* – 1982. – т. 16. – вып. 1. –с.183-190.
17. Карп В.П., Никитин А.П. – Построение пространства информативных характеристик ритмического процесса как этап решения задач классификации. // *Проблемы ритмов в естествознании.* – Мат-лы 2-го междунар. симп. – РУДН. – М. – 2004. – с. 212-215.
18. Романов Ю.А. и соав. – Биологические ритмы чувствительности клеток к воздействиям как основа хронобиологического механизма регуляции гомеостаза их функций. // *Мат-лы 2-го междунар. симп. – РУДН.* – М. – 2004. – с. 362-363.