

## РОЛЬ ВОДЫ В ЭФФЕКТЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В СВЕРХНИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ

*Пальмина Н.П., Белов В.В., Часовская Т.Е., Жерновков В.Е., Мальцева Е.Л.*

Учреждение Российской академии наук Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Россия, Москва, ул. Косыгина 4, E-mail: [npalm@sky.chph.ras.ru](mailto:npalm@sky.chph.ras.ru)

Одним из важных и во многом загадочных открытий последних десятилетий является обнаружение влияния растворов биологически активных веществ (БАВ) в низких (включая пикомолярные) и сверхнизких (фемтомолярные и ниже) концентраций на биологические процессы. Эффекты сверхмалых доз (СМД) были зарегистрированы в экспериментах с веществами различной химической природы и биологического действия: гормонами, антиоксидантами, противоопухолевыми агентами, иммуномодуляторами и др. (Бурлакова, 1986; Ашмарин, 1992; Зайцев, 1993; Bonavida, 1991; Doutremepuich, 1991; Benveniste, 1988; Ямсков, 1999) на системах с различным уровнем биологической организации – от макромолекул и клеточных структур, до целых организмов и популяций. Однако, несмотря на большой объем накопленных за десятилетия экспериментальных данных, до сих пор не создано единой теории, способной объяснить подобные явления. Был выявлен ряд общих закономерностей, характерных для эффектов разнообразных БАВ с СМД, важнейшей из которых является нелинейная зависимость эффекта от дозы БАВ. Наличие подобных закономерностей, возможно, связано с общностью критических мишеней действия БАВ. В качестве последних могут выступать плазматические мембраны (ПМ), поскольку в них сосредоточены важнейшие регуляторные системы, отвечающие за функционирование клетки: системы вторичных посредников (циклических нуклеотидов и фосфоинозитидного цикла), обладающие свойствами каскадного усиления сигнала при проведении его в клетку (Nishizuka, 1984; Yoshimasa, 1987; Taylor, 1986) и система регуляции пероксидного окисления липидов (ПОЛ) (Владимиров, 1972; Бурлакова, 1967). В силу своей общей локализации данные регуляторные системы влияют друг на друга (Yoshimasa, 1987; Bouvier, 1990; Mal'tseva, 1997), поэтому вещества, модифицирующие состояние одной из этих систем, могут индуцировать изменения и в других. Структурно-динамическое состояние липидного бислоя играет существенную роль в функционировании регуляторных систем, локализованных в липидном бислое мембран, так как его изменение влияет на активность и чувствительность мембранно-связанных и липид-зависимых регуляторных белков, ферментов и рецепторов. В связи с вышесказанным, изучение взаимодействия БАВ с различными регионами липидного бислоя биологических мембран, отличающихся по своим биохимическим и регуляторным свойствам, может приблизить нас к решению весьма актуального и важного вопроса о механизме действия БАВ в сверхнизких концентрациях.

В работе проведено исследование действия БАВ (природного и синтетического антиоксидантов –  $\alpha$ -токоферола и фенозана калия; трипептида тиролиберина; форболовых эфиров) в диапазоне концентраций ( $10^{-20}$ – $10^{-4}$  М) на микровязкость и параметр упорядоченности различных областей липидной компоненты биологических мембран. Мембраны картировались с помощью двух спиновых зондов: 5-и 16-доксилстеариновых кислот, нитроксильный фрагмент которых погружен в мембрану на 8 Å и 22 Å, соответственно. Показано, что все БАВ существенно модифицируют структурное состояние; дозовая зависимость представляет собой би- или полимодальную кривую, характерную для веществ, проявляющих эффект в сверхмалых концентрациях; максимальные отклонения от нормы составляли 10–30% для микровязкости липидов (в зависимости от типа используемого зонда); изменение микровязкости липидной компоненты сопровождалось сдвигами в термоиндуцированных структурных переходах и энергиях их активации.

Первоначально рассматривались следующие механизмы действия БАВ в СМД: в области традиционных «физиологических» концентраций ( $10^{-4}$ – $10^{-9}$  М) – ограничения при упаковке углеводородных цепей липидов вблизи молекулы БАВ за счет его неспецифического встраивания в мембрану и взаимодействия с окружающими молекулами фосфолипидов; в области СМД ( $10^{-9}$ – $10^{-18}$  М) – специфического связывания БАВ с лигандами на мембране; инициирования БАВ образования новых высокоупорядоченных микродоменных комплексов в мембране (в частности, рафтов) или модификации уже имеющихся; в области «мнимых» концентраций ( $10^{-18}$ – $10^{-25}$  М) –

изменения структурно-динамических характеристик воды, выступающей в роли полярного растворителя и среды окружающей мембраны. Однако, эксперименты, проведенные с синтетическим антиоксидантом, фенозаном калия (ФК) на липосомах, приготовленных из липидных экстрактов ПМ, показали, что удаление белковой составляющей ПМ практически не влияет на положения максимумов на дозовых зависимостях и положениях и количестве термоиндуцированных структурных переходов. Следовательно, мишенью действия БАВ в СМД являются именно липиды. Это заключение подтверждено изменениями в размерах и форме липосом под действием СМД фенозана калия, зафиксированное методами динамического светорассеяния и атомно-силовой микроскопии.

Полярные свойства воды связывают, прежде всего, со способностью ее молекул образовывать водородные связи друг с другом, что приводит в итоге к формированию короткоживущих водных ассоциатов (кластеров) небольшого размера (Saykally, 1993, Liu, 1996). Мы предположили, что их динамические характеристики (например, параметры флуктуаций, а также взаимодействия между ними) могут играть особую роль в процессе хранения и передачи информации о веществе, причем изменение их будет сказываться на целостной динамической структуре полярной среды. В качестве показателей, характеризующих структуру и динамику, а, следовательно, состояние воды в определенных условиях и при различных воздействиях, в частности БАВ, могут использоваться флуктуации показателей пропускания воды в ИК-области спектра (Фесенко, 1999, Зубарева, 2003, Каргаполов, 2006). С целью выяснения роли динамических характеристик воды в механизме полученных нами ранее эффектов «мнимых» и сверхмалых концентраций БАВ на структуру биологических мембран мы совместно с сотрудниками кафедры общей и биоорганической химии Тверской государственной медицинской академии изучили различие флуктуаций показателей пропускания тонких слоев воды (20 мкм) в девяти диапазонах ИК-спектра: 3500-3200, 3085-2832, 2120-1880, 1710-1610, 1600-1535, 1543-1425, 1430-1210, 1127-1057, 1067-963 см<sup>-1</sup> в водных растворах БАВ в широком спектре концентраций (10<sup>-4</sup>-10<sup>-25</sup> М) по сравнению с бидистиллированной деионизованной водой. В качестве формальной характеристики изменений структурно-динамического состояния воды при отсутствии и в присутствии различных количеств БАВ использовался многомерный дискриминантный анализ на основе критерия Махаланобиса, который учитывает корреляции и дисперсии инфракрасных показателей эталона и образца, что позволило использовать его в качестве целостного показателя. В результате изучения влияния различных концентраций α-ТФ и ТРГ (10<sup>-4</sup> – 10<sup>-25</sup> М) на структурное динамическое состояние водного растворителя, оцененное по критерию Махаланобиса, были получены полимодальные дозовые зависимости с наибольшими отклонениями при действии α-ТФ в СМД 10<sup>-15</sup> и «мнимой» концентрации 10<sup>-20</sup> М; для ТРГ – в интервале концентраций (10<sup>-6</sup>-10<sup>-10</sup>)М и 10<sup>-16</sup>М. Дальнейший анализ позволил выявить две узкие области ИК-спектра (2120-1880 см<sup>-1</sup> и 1710-1610 см<sup>-1</sup>), в которых α-ТФ не поглощает, соответствующие деформационным и деформационно-либрационным колебаниям молекулы воды, в которых дисперсии показателей пропускания 10<sup>-15</sup> и 10<sup>-20</sup> М растворов α-ТФ по отношению к эталону и 10<sup>-9</sup> М раствору были гораздо выше, чем в остальной области спектра. Анализ дисперсий показателей пропускания ИК-спектров растворов ТРГ показал, что высокие концентрации не вызывают сильных и специфических эффектов на флуктуации инфракрасного спектра, в то время как область сверхнизких концентраций (10<sup>-16</sup>М) характеризуется сильными колебаниями флуктуации спектров водных растворов. Наличие таких сильных изменений в динамике спектральных показателей в области СМД свидетельствует о влиянии ТРГ в СМД на динамические процессы, происходящие в воде, на динамику кластерообразования (Зубарева, 2003, Григорьев, 2003). Таким образом, с помощью нового типа ИК-спектрометра – аппаратно-программного комплекса ИКАР – **на основе критерия Махаланобиса обнаружены значительные изменения в структурном динамическом состоянии водного растворителя при введении как «мнимой» (10<sup>-20</sup> М), так и СМД (10<sup>-15</sup>-10<sup>-16</sup> М) БАВ, в окрестностях которых ранее наблюдались изменения структурных характеристик биологических мембран.**

Подобные изменения в ИК-спектрах разбавленных растворов БАВ могут быть обусловлены формированием у гидрофильных поверхностей и частиц, в качестве которых могут рассматриваться и мембраны, «приповерхностных» слоев воды, отличающихся от «объемной» воды по вязкости, плотности, диэлектрической проницаемости, электропроводности (Pollack, 2008). В частности, академиком Коноваловым А.И. с соавторами обнаружено, что многие БАВ с участием растворителя образуют в водных растворах наноассоциаты размером около 200 нм, причём концентрационные зависимости

размеров наноассоциатов и удельной электропроводности растворов имеют полимодальный характер и взаимосвязаны. В наших совместных работах с Коноваловым А.И. и его сотрудниками было установлено, что, действительно, изменение удельной электропроводности растворов БАВ в зависимости от степени их разбавления представляет собой кривую с двумя - тремя максимумами: в области  $10^{-9}$  М ;  $10^{-13}$ - $10^{-16}$  ;  $10^{-18}$ - $10^{-19}$ М, которые разделены областью снижения измеряемого параметра в интервале трех порядков концентраций. Обнаружена статистически достоверная прямолинейная корреляция между размерами наноассоциатов, удельной электропроводностью растворов антиоксидантов и изменением упорядоченности поверхностных слоёв липидов ПМ под действием этих разбавленных растворов. Таким образом, при изменении концентрационных интервалов БАВ различные свойства наноассоциатов меняются, что отражается на изменении величины общего эффекта, оказываемого раствором вещества на клеточные мембраны.

#### **WATER AND EFFECT OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN ULTRA LOW CONCENTRATIONS.**

***N.P. Palmina, VV Belov, T.E. Chasovskaya, V.E. Zhernovkov, E.L. Maltseva***

Emanuel Institute Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, E-mail:

[npalm@sky.chph.ras.ru](mailto:npalm@sky.chph.ras.ru)