

МАТЕРИАЛЫ
III МЕЖДУНАРОДНОГО СИМПОЗИУМА

УДК 612.014.461:615.357

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ВОДНОЙ СРЕДЫ
В МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДОВ
В МАЛЫХ И СВЕРХМАЛЫХ ДОЗАХ

© 2003 г. Е. И. Григорьев*, В. Х. Хавинсон, В. В. Малинин, А. Е. Григорьев,
И. Н. Кочнев, Т. А. Кудрявцева

Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН

Рассматривается корреляция между структурами и конформациями коротких пептидов KE, EW, AEDG и других, их влиянием на динамические свойства воды и зависимости доза-биологический эффект в широком интервале концентраций. Их эффекты на динамику воды изучались по температурным зависимостям (5–45°C) инфракрасных спектров растворов в ближней (5180 см⁻¹) и дальней (200 см⁻¹) областях. Биотестирование *in vitro* определялось по пролиферации тимоцитов, при этом бимодальная зависимость наблюдалась для сверхмалых концентраций (10⁻¹⁷–10⁻¹⁵ моль/л). Авторы предлагают гипотезу, согласно которой для сверхмалых концентраций имеет место образование и дистантная передача сигнала от лиганда к клетке-мишени без образования лигандрецепторного комплекса. Активная роль в этой модели принадлежит водной среде, действующей по солитонному механизму.

Вода, пептиды, биологические эффекты, малые дозы.

В настоящее время достаточно трудно объяснить с классических позиций образования лигандрецепторного комплекса (ЛРК) феномены действия сверхмалых доз – практическое отсутствие молекул лиганда вблизи клетки-мишени, сложный бимодальный характер зависимости доза-эффект [1, 2], присутствие в больших количествах тех же [3] или химически родственных эндогенных веществ. С другой стороны, остаются без ответа и многие проблемы в сложных механизмах лиганд-рецепторного взаимодействия вообще [4], например, возможность образования ЛРК для лигандов с резко различающимися пространственными и химическими структурами. В ряде работ ставится вопрос о важной роли воды в этих процессах [5, 6]. На наш взгляд, все эти первостепенные вопросы, затрагивающие самые начальные стадии формирования и передачи сигнала, являются безусловно тесно взаимосвязанными и определяющими для запуска каскадных процессов, приводящих к конечному биологическому ответу. Имеющиеся данные, по нашему мнению, позволяют поставить под сомнение абсолютную необходимость образования комплементарного ЛРК во всех случаях передачи сигнала. Это особенно актуально при использовании сверхмалых доз (СМД) лигандов, где возможность образования самого ЛРК резко снижается (от 10⁻¹²–10⁻¹³ моль/л) или

практически сводится к нулю (10⁻¹⁸ моль/л и ниже). Целью данной работы является изучение роли воды в механизмах формирования и трансляции сигнала от молекул лигандов к клеткам-мишеням.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В качестве объектов исследования были использованы синтезированные нами пептиды Lys-Glu (I) [7] – вилон® и Ala-Glu-Asp-Gly (II) – эпیتالон® [8], а также некоторые другие модельные дипептиды, чистота препаратов по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии не ниже 99% (“Beckman, 126 SM, 168 DADM”, США). Конформационные характеристики получали в поле MM2 (среда вода, CChem3DPro). Изучение влияния вилона и эпیتالона на пролиферативную активность тимоцитов проводилось на мышьяк-самцах линии (CBA × C₅₇BL₆)F₁ [9]. Пептиды вносили в инкубационную среду в концентрациях от 10⁻⁷ до 10⁻¹⁸ моль/л. Температурные зависимости параметров ИК-спектров в ближней (5180 см⁻¹) и дальней (200 см⁻¹) областях для водных растворов препаратов определяли при 5–45°C. Использовали деионизованную воду (уд. сопротивление ≥17 МОм/см, “Labconco Water Pro PS”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что внесение пептидов в инкубационную среду, содержащую взвесь тимоцитов и конканавалина А (Кон А), приводило к усилению включения меченого ³H-тимидина в ДНК делящихся

*Адресат для корреспонденции: 197110 Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3, Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии; тел./факс: (812) 230-00-49; e-mail: ibg@mail/wplus/ru.

ся клеток, т.е. пептиды оказывали комитогенное действие на пролиферацию тимоцитов. Наиболее выраженным действием обладал вилон (усиливал реакцию бласттрансформации в 1.4–2.8 раза), наименее выраженную активность проявлял эпиталон (рис. 1, а). Вилон также оказался пептидом, в наибольшей степени усиливающим комитогенное действие интерлейкина-1 (ИЛ-1) (в 1.6 раза) (рис. 1, б). Обращает на себя внимание наличие у рассматриваемых зависимостей доза-эффект сложной бимодальной кривой с двумя выраженными максимумами, причем первый максимум в области 10^{-9} – 10^{-10} моль/л, а второй в области СМД – 10^{-15} – 10^{-16} . Мы полагаем, что для правильного объяснения феноменов СМД необходимо прежде всего изначально придерживаться реальных экспериментальных условий, а именно, – учитывать факт возможного отсутствия молекул лиганда непосредственно у клетки – мишени для указанных выше условий (сверхмалые концентрации) и, вследствие этого, признать весьма вероятной передачу сигнала для активации клетки-мишени без образования ЛРК.

Ранее мы впервые предложили вероятный дистантный механизм формирования и передачи сигнала от молекул лиганда к клеткам-мишеням в водной среде с участием солитонов воды и привели экспериментальные данные, подтверждающие принципиальную возможность протекания подобных процессов [10]. Солитонная модель структуры воды в настоящее время наиболее полно объясняет ее уникальные свойства, публикуются конкретные расчетные и экспериментальные данные, связанные с концентрацией солитонов, обсуждается влияние температуры, магнитных полей, предлагаются 3D-модели объемной вязкой структуры, вдоль которой распространяются солитоны и др. [11]. Данные о рассеянии медленных нейтронов свидетельствуют о существовании солитонов в воде [12]. Кроме того, многое позволяет рассматривать именно водную среду как одну из универсальных рецепторных систем слабых электромагнитных полей различных диапазонов [13].

По-видимому, для объяснения бимодальной зависимости доза-эффект вполне возможно предположить, что в общем случае первый пик для относительно больших концентраций (~ от 10^{-10} до 10^{-7} моль/л) соответствует классическому механизму образования ЛРК, т.е. контактной рецепции, при этом минимально наблюдаемые константы диссоциации ЛРК для большинства изученных соединений находятся именно в этом диапазоне: 10^{-10} – 10^{-11} моль/л.

Второй пик для СМД (примерно от 10^{-14} моль/л и ниже) соответствует бесконтактному механизму рецепции (ничтожно малое или полное отсутствие молекул лиганда), который мог бы осуще-

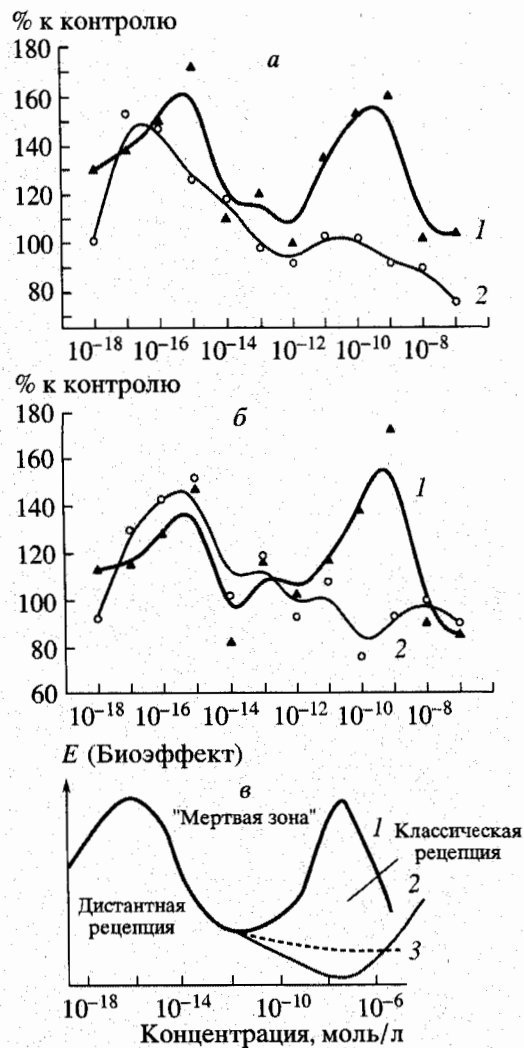


Рис. 1. а – Комитогенное действие вилона (1) и эпиталона (2) на пролиферацию тимоцитов мышей, стимулированных Кон А (в % к контролю). б – Влияние вилона (1) и эпиталона (2) на пролиферативную активность тимоцитов мышей на фоне действия ИЛ-1 (в % к контролю). в – Гипотетическое разделение зависимости доза-эффект по типам рецепции для малых и сверхмалых доз.

ствляться дистантно с участием солитонов воды. Между этими пиками находится “мертвая зона”, где не реализуются (или реализуются в незначительной степени) ни тот, ни другой типы рецепции (рис. 1, в).

Можно предположить, что в “мертвой” зоне концентрация лиганда уже стала ниже предельной для образования ЛРК, а для волновой, солитонной передачи она еще остается слишком высокой, сигнал слишком интенсивный по амплитуде и не воспринимается регистрирующим устройством мембраны, настроенным на резонанс с гораздо более слабым сигналом. Важным наблюдением является тот факт, что вилон и эпиталон проявляют

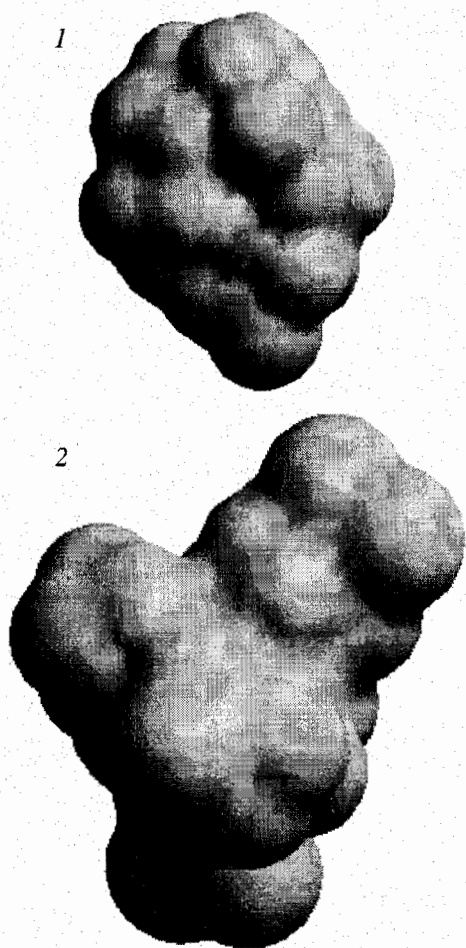


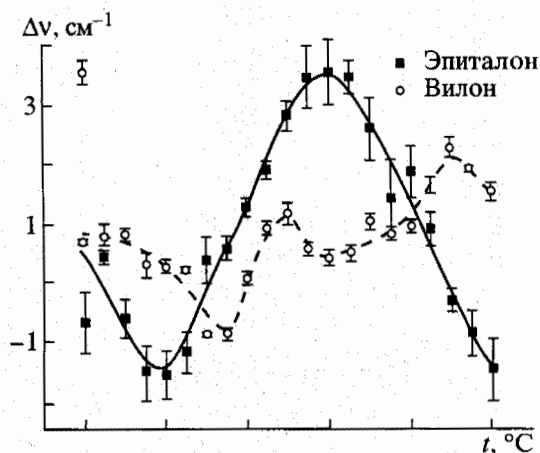
Рис. 2. Доступные растворителю поверхности для минимизированных конформаций (MM2, среда вода, CSChem3DPro) для ионизированных молекул вилонина (H-Lys-Glu-OH) (1) и эпیتالона (H-Ala-Glu-Asp-Gly-OH) (2).

1 – Мол. вес: 275.31; формальный заряд: 0; доступная растворителю поверхность: 437 \AA^2 ; объем без растворителя: 229 \AA^3 ; количество ионогенных групп: NH_3^+ (2), COO^- (2).

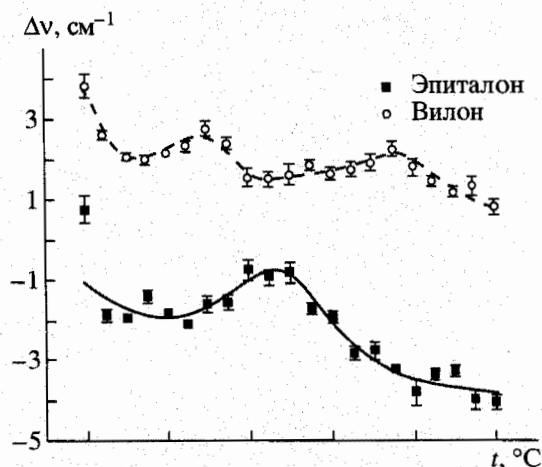
2 – Мол. вес: 388.34; формальный заряд: -2; доступная растворителю поверхность: 566 \AA^2 ; объем без растворителя: 308 \AA^3 ; количество ионогенных групп: NH_3^+ (1), COO^- (3).

вполне сопоставимую биологическую активность в двух одинаковых биотестах.

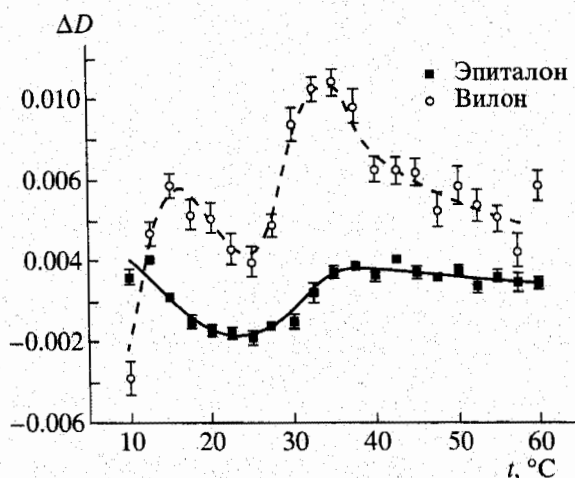
Между тем их первичные структуры, общие геометрические размеры молекул, число и топография групп, потенциально способных к связыванию, формальные заряды, а также энергетически выгодные конформации существенно различаются (рис. 2) и, по-видимому, не могут приводить к однотипному комплементарному связыванию с одними и теми же рецепторами.



Смещение максимума полосы поглощения 5180 cm^{-1} для 1%-ных водных растворов эпیتالона и вилонина при pH7.



Смещение полуширины полосы поглощения 5180 cm^{-1} для 1%-ных водных растворов эпیتالона и вилонина при pH7.



Смещение оптической плотности максимума 5180 cm^{-1} для 1%-ных водных растворов эпیتالона и вилонина при pH7.

Рис. 3. Температурные зависимости ИК-спектров водных растворов вилонина (H-Lys-Glu-OH) и эпیتالона (H-Ala-Glu-Asp-Gly-OH).

Мы предполагаем, что в общем случае, и это очень часто наблюдается на практике, разные по строению лиганды могут приводить к сходному биологическому эффекту, если они участвуют в продуцировании в водной среде однотипных солитонных сигналов к клеткам-мишеням. Косвенным экспериментальным подтверждением этому может являться вид температурных зависимостей параметров ИК-спектров водных растворов препаратов в ближней области (5180 см^{-1}) (рис. 3). Как показано ранее [10, 14], такие различные немонотонные зависимости, индивидуальные для каждого пептида, резко отличающиеся от данных по составляющим их отдельным аминокислотам, могут косвенно свидетельствовать о существовании солитонов воды с различными характеристиками до и после их взаимодействия с молекулами лиганда, причем однотипные немонотонности, по всей видимости, отражают и сходную природу распространяющегося в воде сигнала.

В дополнение к ранее опубликованным [10, 14], приводятся и некоторые новые данные по температурным зависимостям ИК-спектров водных растворов ряда изученных нами пептидов, а также 3D-диаграммы, позволяющие наглядно представить волнообразные немонотонности, индивидуальные для каждого соединения (рис. 4, 5). Солитонная гипотеза передачи сигнала вполне может объяснить, на наш взгляд, процесс амплификации сигнала (распространение во всех направлениях и одновременное достижение многих клеток) и преимущества по проникающей способности по сравнению с пассивной диффузией молекул БАВ в межклеточном матриксе [5]. Солитоны воды, по всей видимости легко проникающие на расстояния в биологических средах, несущие информацию о молекулах БАВ, обладающие энергетическим импульсом, свойствами волны и частицы, являются, по нашему мнению, тем оптимальным физическим объектом (в отличие от статических водных структур, кластеров и т.п.), которые в наилучшей степени выполняли бы функции носителя сигнальной информации. Главное – становится возможным объяснить отсутствие молекул лигандов вблизи клеток-мишеней, что абсолютно не поддается с позиций образования классического ЛРК.

С точки зрения гипотез о возможности рецепции самой мембраной-сенсором или тонким слоем приповерхностной воды, наши предположения о дистантной передаче сигнала к клетке-мишени с помощью солитонов воды приобретают более законченный характер. Вполне вероятно также, что присутствие эндогенных лигандов (часто в комплексах с белками-носителями) и вообще микроокружения влияет на формирование общего волнового, полевого гомеостаза в локальной области межклеточной жидкости данного вида ткани (динамическое равновесное состояние), а ре-

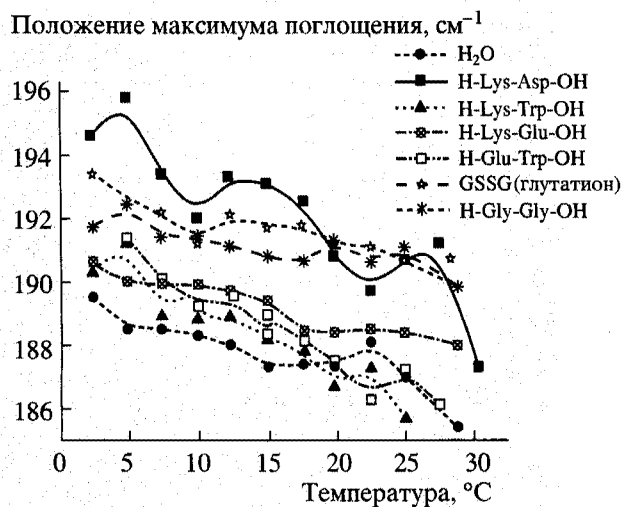


Рис. 4. Изменения положения максимума поглощения 1%-ных водных растворов модельных пептидов в зависимости от температуры.

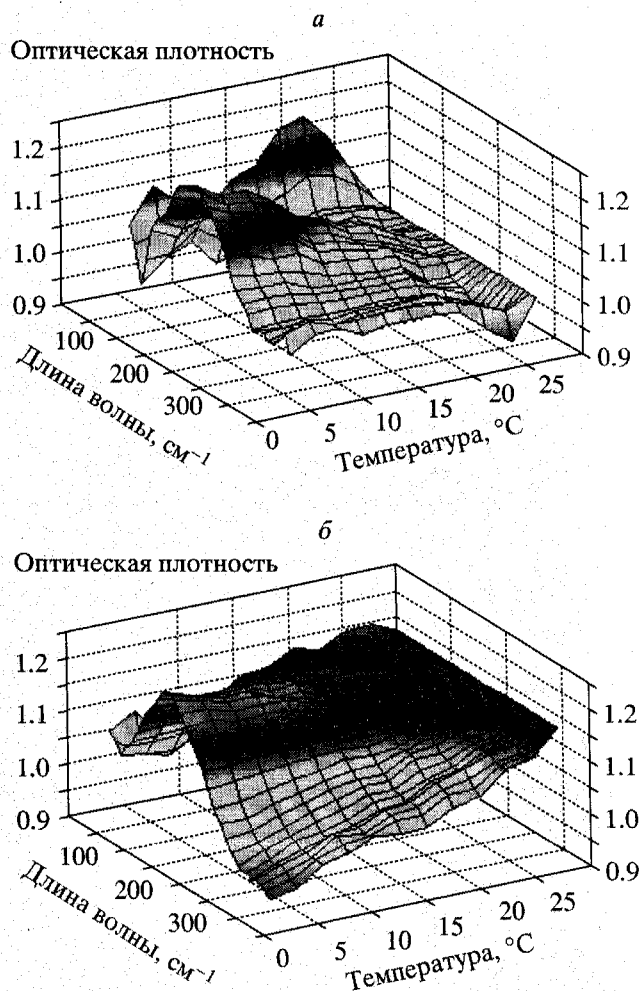


Рис. 5. 3D-диаграммы температурных зависимостей изменения максимума поглощения для 1%-ных водных растворов тимогена H-Glu-Trp-OH (а) и вилона H-Lys-Glu-OH (б) (программа Harvard ChartXL).

цептор (сенсор-мембрана) регистрирует, вероятно, только его критические изменения в каких-то определенных частотно-амплитудных диапазонах. Как показывает анализ ситуации с позиций нелинейной физики, такие, даже очень слабые изменения, могут приводить к значительным, непропорционально большим эффектам управления [14].

Так можно было бы объяснить действие биологически активного вещества (БАВ) в присутствии большого избытка эндогенного лиганда. Кроме того, на наш взгляд, открывается возможность объяснения с единых позиций эффекта БАВ в сверхмалых дозах (включая, возможно, гомеопатию) и воздействия на организм внешнего излучения во всех проявлениях. В своих индивидуальных механизмах они могут иметь общую часть, связанную с изменением динамики воды в межклеточном пространстве ткани-мишени и в водном объеме вводимого препарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурлакова Е.Б. // Рос. хим. журн. 1999. Т. 43. № 5. С. 3–11.
2. Сазанов Л.А., Зайцев С.В. // Биохимия. 1992. Т. 57. Вып. 10. С. 1443–1459.
3. Лелекова Т.В., Романовский П.Я., Александров П.Н., Ашмарин И.П. // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1989. Т. 108. № 7. С. 8–10.
4. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И. Рецепторы. М.-Волгоград, 1999.
5. Ямскова В.П., Ямсков И.А. // Рос. хим. журн. 1999. Т. 43. № 3. С. 74–79.
6. Зенин С.В., Тяглов Б.В. // Физ. химия. 1994. Т. 68. № 4. С. 636–641.
7. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Малинин В.В. Пептидные тимомиметики. СПб.: Наука, 2000.
8. Khavinson V.Kh., Goncharova N., Lapin B. // Neuroendocrinology Lett. 2001. V. 22. P. 251–254.
9. Хавинсон В.Х., Рыбакина Е.Г., Малинин В.В. и др. // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2002. Т. 133. № 5. С. 574–577.
10. Григорьев Е.И., Хавинсон В.Х., Кочнев И.Н., и др. // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2002. Т. 133. № 5. С. 525–529.
11. Пономарев О.А., Сусак И.П., Фесенко Е.Е., Шугаев А.С. // Биофизика. 2002. Т. 47. Вып. 3. С. 395–410.
12. Petrillo C., Sacchetti F., Dorner B., Suck J.B. // Phys. Rev. E. Stat. Phys. Plasmas Fluids Relat. Interdiscip. Topics. 2000. V. 62. № 3. Pt. A. P. 3611–3618.
13. Фесенко Е.Е., Попов В.И., Новиков В.В., Хуцян С.С. // Биофизика. 2002. Т. 47. Вып. 3. С. 389–394.
14. Кочнев И.Н., Халошмов А.И., Григорьев Е.И. и др. // Биофизика. 2002. Т. 47. Вып. 1. С. 12–19.

Поступила в редакцию
09.12.2002

Study on the Role of Water Medium in Mechanism of Action of Peptides in Low and Super-low Doses

E. I. Grigoriev, V. Kh. Khavinson, V. V. Malinin, A. E. Grigoriev,
I. N. Kochnev, T. A. Kudriavtseva

St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, St. Petersburg, 197110 Russia;
e-mail: ibg@medport.ru

The correlation between the structures and conformations of short peptides KE, EW, AEDG and other, their influence on the dynamic properties of water and dose/biologic effect dependencies in a wide range of concentrations were regarded. Their effects on the dynamic properties of water were studied by temperature dependencies (5–45°C) of infrared spectra of the solutions in the near (5180 cm⁻¹) and far (200 cm⁻¹). In vitro biotesting included the determination of the proliferative activity of thymocytes, a bimodal curve with the second maximum were detected at super-low doses (10⁻¹⁷–10⁻¹⁵ mol/l). Authors propose a hypothesis that for super-low concentrations the formation and distance transmission of a signal from ligand to a target cell without the formation of any ligand-receptor complex take place. An active role in this model belongs to water medium acting according to the soliton mechanism.