

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  $n_1, n_2, \dots, n_i$ ).

Иногда добавляют напряженность внешнего электрического и/или магнитного поля.

Существуют, однако, объекты, для которых подобный подход явно недостаточен. К ним относятся биологические системы и объекты, сделанные биологическими системами (людьми). Для описания таких объектов необходимо ввести понятие «конструкция». Дадим определение этого понятия.

Конструкция статистической системы определяется набором выделенных (механических) степеней свободы, которые не обмениваются энергией с тепловыми степенями свободы (с термостатом) за данный, выбранный наблюдателем интервал времени. В этой формулировке главным является обязательное включение в термодинамическую проблему наблюдателя и времени.

В терминах статистической физики конструкция ограничена областью фазового пространства, выйти за пределы которого система может только в результате возбуждения выделенных (механических) степеней свободы.

Различают два типа молекулярных конструкций: фермы и машины (рис. 1). Возбуждение выделенных степеней свободы машины сопровождается передачей энергии (силы) и может приводить к совершению работы.



Рис. 1. Два типа молекулярных конструкций

Есть еще одна особенность молекулярных конструкций, резко отличающая их от систем, не связанных с биологическими объектами. Физик, исследуя какую-либо систему, обычно задает два главных вопроса: *как?* и *почему?* Так, например, можно спросить: какова структура кристалла поваренной соли? И получить ответ: кристалл имеет кубическую симметрию, вокруг каждого иона натрия на вершинах куба расположены шесть ионов хлора, а вокруг каждого иона хлора — шесть ионов натрия. Далее физик спросит: почему кристалл NaCl построен именно так? И получит ответ: потому что такая структура отвечает минимуму энергии системы. Вопросы «почему?» вслед за первым можно задавать очень долго, пока не получишь ответ: «Это так, потому что это так», иначе говоря, пока не дойдешь до основных, недоказуемых постулатов, являющихся обобщением экспериментов и верных до тех пор, пока новые опыты не вступают с ними в противоречие.

Биологические системы и конструкции, сделанные ими, имеют цель [8]. Это значит, что, кроме указанных выше двух вопросов, можно задать вопрос *для чего?* или *зачем?* Так, например, можно спросить: «для чего молекула  $\gamma$ -глобулина имеет такую-то структуру?» и получить ответ: «для того, чтобы выполнять иммунологическую функцию, что необходимо для выживания организма и вида». Цель биологическим конструкциям задает биологическая эволюция.

Конструкции всегда неравновесны. В ходе функционирования конструкция биологических систем может изменяться, но и промежуточные состояния, как правило, неравновесны.

Как известно, существует два типа неравновесности: термодинамическая, т.е. система поддерживается в неравновесном стационарном состоянии за счет непрерывного поступления энергии или вещества из-

вне [9—11], и кинетическая, когда неравновесность не связана с притоком энергии или вещества извне, а система остается неравновесной потому, что за время наблюдения не успевает релаксировать, не успевает изменить свою конструкцию.

Все биологические объекты и их важнейшие компоненты кинетически неравновесны. Снятие кинетического запрета и изменение конструкции не требует изменения обмена энергии между системой и термостатом. Локальное возмущение, иногда энергетически или энтропийно ничтожное, может сделать кинетически доступными («отодвинуть защелку») другие конфигурации конструкции. Это требует корреляции между характеристиками возмущающего агента, например субстрата ферментативной реакции, и конструкции системы, например конформации фермента.

Все важнейшие биологические конструкции на макромолекулярном и более высоких уровнях не возникают самопроизвольно в соответствии с обычными требованиями термодинамики и кинетики. Они приготовлены, сделаны с определенной целью, т.е. имеют смысл. О том, как возникает смысл в результате запоминания случайного выбора, подробно рассмотрено в [8].

### О роли слабых взаимодействий в химических процессах (к истории вопроса)

Обратимся к первым попыткам рассмотрения возможных механизмов воздействия очень слабых возмущений на протекание химических реакций. Подходы, использованные в этих попытках, в значительной степени устарели (частично стали тривиальными, частично неверными), но некоторые, высказанные тогда идеи, оказались полезными в дальнейших работах.

В конце 50-х — начале 60-х годов в Институте химической физики АН СССР С.П. Солодовниковым были поставлены эксперименты с целью оценить частоту делокализации электрона в сложных молекулах [12, 13]. Для такой оценки использовали некоторые особенности спектров электронного парамагнитного резонанса ароматических анион-радикалов. Еще в 1958 г. Туттль и Вайсман [14] обнаружили, что щелочные металлы реагируют с ароматическими соединениями, при этом электрон переносится от металла на органическую молекулу с образованием анион-радикала. Спектры ЭПР таких анион-радикалов были исследованы и интерпретированы [15—17].

Солодовников исследовал спектры ЭПР некоторых анион-радикалов, в которых неспаренный электрон может быть локализован на двух ароматических кольцах, разделенных цепочкой из нескольких насыщенных связей. Было обнаружено, что даже при мостике из двух  $\text{CH}_2$ -групп (анион-радикал  $[\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5]^-$ ) неспаренный электрон одинаково взаимодействует с эквивалентными протонами обоих бензольных колец. Было высказано предположение о том, что заключение о наличии или отсутствии делокализации электрона (на языке химии — о наличии или отсутствии сопряжения) зависит от метода наблюдения: если частота  $\nu$  переноса электрона от одной потенциальной ямы (в данном случае бензольного кольца) к другой меньше обратного характерного времени метода наблюдения  $\tau$  (в данном случае значения постоянной сверхтонкой структуры в единицах времени), то наблюдатель регистрирует локализацию электрона в одном бензольном кольце. При  $\nu > 1/\tau$

наблюдатель «увидит» электрон, делокализованный по двум бензольным кольцам.

Идея Солодовникова была развита в нашей работе с Воеводским [18]. Слабые электронные взаимодействия, энергии которых меньше  $kT$ , но соответствующая частота которых превышает обратную величину характерного времени химической реакции, могут определять возможность ее протекания. В этой работе впервые шла речь об «управляющих взаимодействиях» в химии, характеризуемых не столько энергией, сравнимой с  $kT$ , сколько временем, сравнимым с характерным временем исследуемого процесса. В работе [18] было также высказано (правда, весьма нечетко) мнение, что такие слабые взаимодействия могут играть роль в ферментативном катализе, особенно в случае реакций, связанных с переносом электрона.

В продолжение этой работы был проведен квантово-механический анализ этих предположений, введены понятия делокализации электрона в стационарном и динамическом смысле и характерного времени метода измерения (последним может быть и химическая реакция) [19]. В простейшем случае, рассмотренном в [19], локализация электрона на время большее, чем характерное время элементарного акта реакции, приводит к появлению нестационарного квантового состояния с измененной реакционной способностью. В более сложных, в частности, биологических системах локальное возмущение, например, присоединение субстрата к активному центру фермента вызывает возникновение неравновесного состояния всего субстрат-ферментного комплекса.

#### Энергетический фактор биологических систем: энтропия или энтальпия?

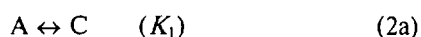
Работа, получаемая за счет любого процесса, может быть связана как с изменением свободной энергии Гиббса, так и с изменением свободной энергии Гельмгольца (как правило, в биологических системах процессы идут практически в изобарных и изохорных условиях):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1); \quad \Delta F = \Delta U - T\Delta S \quad (2)$$

где  $H$  – энтальпия;  $S$  – энтропия системы;  $U$  – внутренняя энергия системы.

В интересующих нас биологических системах трансформацию энергии, обеспечивающую преодоление активационного барьера в ферментативных реакциях, в мембранных процессах, при фотофосфорилировании, мышечном сокращении и т.д., осуществляют устройства, принадлежащие к классу химических машин. Во всех этих случаях речь идет о сопряжении двух химических реакций: энергодонорной и энергоакцепторной. Энергия, освобождаемая в результате протекания энергодонорной реакции, тратится на реализацию энергоакцепторной реакции. Согласно (1), эти системы могут функционировать как энтропийные и энтальпийные машины.

Начнем рассмотрение с энтропийных машин. В качестве примера такой «машины» можно взять сопряженный химический процесс, в котором сдвиг равновесия в одной реакции приводит к смещению равновесия в другой реакции благодаря наличию общего промежуточного продукта [20]:



где  $K_1$  и  $K_2$  – соответствующие константы равновесия реакций.

Отметим, что никакого переноса энергии между процессами (2a) и (2b) не происходит. Любой элементарный акт превращения  $A$  в  $C$ ,  $C$  в  $A$  или  $B$ ,  $B$  в  $A$  приводит либо к получению энергии из термостата, либо к отдаче энергии в термостат и не влияет непосредственно на возможность реализации других элементарных актов.

Как уже сказано выше, механизмы этого типа часто используют для описания энергетического сопряжения химических реакций: энергодонорная реакция (2a) обеспечивает протекание энергоакцепторной реакции (2b).

Оценим эффективность такого сопряжения. В качестве меры эффективности  $\gamma$  выберем отношение числа результирующих элементарных актов  $n_2$  энергоакцепторного процесса  $C \rightarrow B$  к числу элементарных актов  $n_1$  сопряженного энергодонорного процесса,  $A \rightarrow C$ :

$$\gamma = n_2/n_1 \quad (3)$$

Пусть в исходном состоянии системы реакция (2a) не идет (например, нет фермента) и концентрации компонент  $a$  и  $c$  не соответствуют равновесным:  $c/a < K_2$ . Реакция (2b) удовлетворяет условию химического равновесия:  $b/c = K_2$ . Отметим, что в нашем случае обозначения « $a$ », « $b$ » и « $c$ » могут относиться как к количествам соответствующих соединений, так и к их концентрациям (реакции мономолекулярны и объем одинаков для всех реагентов).

Иницилируем реакцию (2a). В результате после достижения равновесия количество  $a$  уменьшится на  $n_1$ ,  $c$  превратится в  $c + n_1 - n_2$ , а  $b$  – в  $b + n_2$ . Легко показать, что эффективность энергетического сопряжения при этом будет равна

$$\gamma = n_2/n_1 = K_2/(1+K_2) \quad (4)$$

Следует обратить внимание на две особенности уравнения (4). Эффективность энергетического сопряжения по механизму Шилова [20] зависит в этом случае только от константы равновесия энергоакцепторной реакции  $K_2$  и может быть достаточно высокой (близкой к единице) лишь при больших значениях  $K_2$ . Это собственно означает, что высокую эффективность превращения можно достигнуть лишь в тех случаях, когда «энергоакцепторная» реакция энергетически выгодна и, следовательно, не требует протекания энергодонорной реакции. Более подробно различные варианты такого энергетического сопряжения химических реакций рассмотрены в [21, 22].

Конечно, даже при  $K_2 \ll 1$  при достаточно длительном протекании энергодонорной реакции (2a) и сравнительно медленном протекании реакции (2b) можно накопить большой избыток промежуточного продукта  $C$  и перейти в стационарный режим с эффективностью  $\gamma = 1$ . Стационарный режим реализуется при непрерывном поступлении исходного продукта  $A$  и отвода конечного продукта  $B$  после накопления сверхравновесной концентрации промежуточного продукта  $C$ . Однако многочисленные эксперименты свидетельствуют о том, что максимальная эффективность элементарного акта ферментативного превращения достигается практически мгновенно после начала энергодонорной реакции, даже если исходная концентрация промежуточного продукта  $C$  близка к нулю [22, 23].

Таким образом, трансдукция энергии между элементарными актами химических превращений не может быть непосредственно реализована за счет энтропийной компоненты изменения свободной энергии

системы. «Работает» только энтальпийная составляющая. Даже в типичных «энтропийных машинах», как например в концентрационных гальванических элементах, обязательным условием является превращение тепловой энергии термостата в «сохраняемую» форму потенциальной энергии, которая с помощью специального устройства может передаваться от одного участника процесса другому непосредственно, не диссипируя в термостат, если не принимать во внимание неизбежного трения или его аналогов, например, джоулевых потерь. Подробнее об этом см. в [22].

Итак, энергопреобразующие системы биологических объектов должны функционировать как энтальпийные молекулярные машины.

Что касается роли в поведении систем таких ее характеристик как энергия и сила, то еще в 1939 г. будущий Нобелевский лауреат Ричард Фейнман в статье «Силы в молекулах» указал, что основным параметром, определяющим стабильность молекулярной конструкции, является не энергия системы, а ее первая производная по координате, т. е. сила [24].

Эта проблема применительно к биологическим системам рассмотрена ниже на примере ферментативного катализа.

#### Релаксационная концепция механизма ферментативного катализа

В основе рассматриваемого ниже подхода к выяснению механизма биокатализа лежат идеи о конформационных изменениях молекулы фермента в ходе катализируемой реакции и о важной роли этих изменений в ферментативной активности. Эти идеи были выдвинуты много лет назад, обзор экспериментальных и теоретических работ в этом направлении, предшествующих появлению релаксационной концепции, можно найти, например, в [15].

Насколько мне известно, первый подход к рассмотрению ферментативной реакции с привлечением релаксационных представлений был сформулирован в 1970 г. в пионерской работе Сидоренко и Дещеревского [25]. Согласно этой работе, после завершения ферментативного цикла и отщепления молекулы продукта от глобулы фермента последняя остается в конформационно неравновесном состоянии. Время релаксации этого состояния сравнимо с интервалом времени между двумя последовательными каталитическими актами для одиночной молекулы фермента. В этом случае каталитическая активность фермента должна зависеть от момента времени присоединения субстрата к молекуле фермента после диссоциации продукта в предыдущем цикле оборота фермента. Были предложены две соответствующие математические модели биокатализа, каждая из которых приводит к кинетике процесса, отличающейся от классической схемы Михаэлиса—Ментен.

Главным в подходе Сидоренко и Дещеревского было утверждение, что конформационная релаксация функционирующей молекулы фермента может играть важную роль в ферментативной активности. В то же время сам механизм превращения субстрата в продукт оставался в рамках классических представлений. Конформационные изменения в ходе релаксации фермента влияют на его активность, но не участвуют непосредственно в элементарном химическом акте.

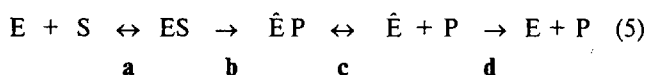
По-видимому, первое утверждение об отклонении элементарного каталитического акта ферментативной

реакции от подходов классической термодинамики и кинетики было высказано в 1971 г. [26]. Было показано, что приложение основных постулатов теории активированного состояния к большинству ферментативных процессов приводит к физически бессмысленным значениям активационных параметров (энергии и энтропии активации). Функционирование фермента скорее аналогично работе механической конструкции, а не гомогенной каталитической химической реакции.

В 1972 г. предложена самосогласованная феноменологическая теория ферментативного катализа [27, 28], а в 1976 г. В.М.Файн [29] разработал общую теорию кинетики химических реакций с участием высокоупорядоченных молекулярных структур, которая базируется на основных постулатах релаксационной концепции. Файн дал самосогласованное описание одновременных изменений электронной и ядерной подсистем и получил уравнения, показывающие необычное поведение ферментативных процессов. Для высокоупорядоченных макромолекулярных систем в ходе безызлучательной релаксации избыток электронной энергии может быть трансформирован в энергию когерентных колебаний ядерной подсистемы без быстрой диссипации энергии в термостат.

Сформулируем основную идею релаксационной концепции ферментативного катализа. Речь идет не просто о том, что конформационная релаксация фермент-субстратного комплекса приводит к изменению каталитической активности фермента. Связывание субстрата с активным центром фермента инициирует конформационную релаксацию, действующую как движущая сила, которая перемещает химическую систему (молекула субстрата в каталитическом центре) вдоль координаты реакции.

Согласно релаксационной концепции примитивную схему ферментативной реакции можно записать следующим образом:



В этой предельно упрощенной схеме представлены два типа стадий: 1) быстрые обратимые стадии связывания субстрата S с ферментом E (стадия a) и отщепления продукта  $\hat{E}P$  (c); 2) практически необратимые медленные релаксационные стадии (b) и (d).

Каждая релаксационная стадия может быть записана в виде последовательности огромного числа обратимых элементарных актов (диссоциации или образование вторичных связей, поворот некоторых групп вокруг одиночных ковалентных связей и т.п.). После каждого элементарного акта системе представляется набор возможных и невозможных в данной мгновенной ситуации дальнейших элементарных актов, и движение по пути релаксации осуществляется методом бесчисленных проб и ошибок, с чем собственно и связана медленность релаксации. Детальное рассмотрение всего процесса можно найти, например, в [21].

Химическое превращение субстрата в продукт ( $S \rightarrow P$ ) — один из бесчисленных элементарных актов в ходе конформационной релаксации фермент-субстратного комплекса, перед которым система достигает «нужной» конфигурации.

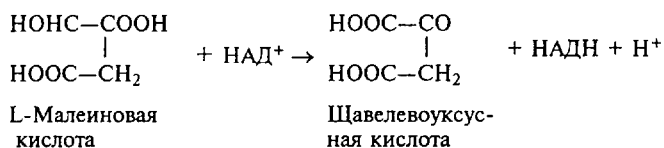
Возможность микроскопического описания релаксации макромолекулярных соединений, исходя только из общих принципов статистической физики, исключена по техническим (и не только) причинам. Хотя

каждый элементарный акт обратим, суммарные процессы **b** и **d** практически необратимы. Это позволяет рассматривать переход от ES к KP как механическое движение, которое прекратится после достижения равновесного состояния всего ферментного комплекса. Возникновение необратимости в ходе релаксации фермента аналогично ситуации в классической теории динамических систем и физической кинетики. Поведение систем, состоящих из огромного числа частиц и выведенных из равновесия, становится необратимым несмотря на обратимость каждого элементарного акта (упругие столкновения частиц и т.п.) [30—32].

Из вышесказанного следует, что пути релаксации для прямой и обратной ферментативной реакции (упрощенная схема 5) могут быть различны. Экспериментальные данные и ссылки на соответствующие работы приведены в монографиях [1, 21, 22].

#### Экспериментальное свидетельство в пользу релаксационной концепции ферментативного катализа

Рассмотрим одно из экспериментальных свидетельств возникновения неравновесных конформационных состояний белков и роли их релаксации в функционировании ферментов [33, 34]. В эксперименте с использованием метода остановленной струи (*stop-flow technique*) следили одновременно за структурными изменениями белковой глобулы и за кинетикой катализируемого процесса в ходе прямой и обратной реакций, идущих при участии растворимой цитоплазматической малатдегидрогеназы и кофермента НАД:



Соответствующие измерения проводили в ходе каждого ферментативного цикла (одного оборота фермента). Конформационные изменения в малатдегидрогеназе регистрировали, измеряя среднее время жизни  $\tau_f$  собственной флуоресценции триптофанового остатка. Известно, что этот параметр чувствителен к непосредственному окружению триптофана в белковой глобуле. Химическое превращение субстрата — малеиновой кислоты детектировали по изменению окислительно-восстановительного состояния кофермента, измеряя оптическую плотность образца при 340 нм (максимум поглощения НАДН).

Числа оборота фермента для прямой и обратной реакции равны, соответственно,  $5,5 \cdot 10^3$  и  $2,3 \cdot 10^4$  мин<sup>-1</sup>. Это значит, что один акт прямой реакции занимает 10,9 мс, а обратной реакции — 2,6 мс.

Кинетические характеристики прямой и обратной реакции не зависят от метода иницирования: добавление субстрата к смеси фермента и кофермента или добавление смеси кофермента с субстратом к раствору фермента. После иницирования прямой реакции структурно-чувствительный параметр  $\tau_f$  уменьшается от исходного равновесного значения 3,1 мс до минимального значения ~ 2,4 мс через  $t = 6$  мс. В конце первого цикла ( $t = 11$  мс) величина  $\tau_f$  возвращается к исходному значению, а затем снова уменьшается с началом развития второго цикла. Восстановление НАД начинается только через 3-4 мс после инициро-

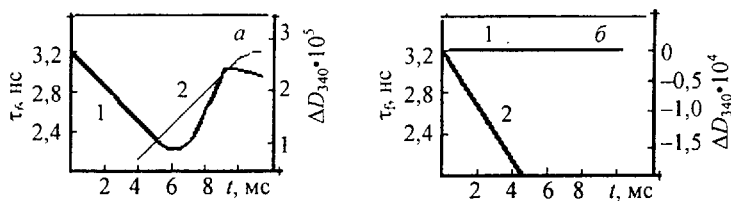


Рис. 2. Кинетические кривые (1) и конформационные изменения (2) фермент-субстратного комплекса для прямой (а) и обратной (б) реакции, катализируемой малатдегидрогеназой

вания реакции. Таким образом, образование продукта происходит только после завершения сравнительно значительных структурных изменений белковой глобулы.

Совершенно иначе ведет себя обратная реакция. Протекание этой реакции практически не сопровождается изменениями  $\tau_f$ , а образование продукта начинается сразу после смешивания участников реакции. Схемы, иллюстрирующие результаты эксперимента, приведены на рис. 2.

Полученные данные можно рассматривать как прямое доказательство того, что растворимая малатдегидрогеназа катализирует прямую и обратную реакции, находясь в различных конформационных состояниях. Пути этих процессов не совпадают.

Кроме того, результаты проясняют также механизм так называемых гистерезисных или мнемонических ферментов, которые достигают максимальной активности только после завершения многих оборотов фермента. Обычно рассматривают два варианта объяснения активации таких ферментов: а) постепенное увеличение активности каждой молекулы фермента с каждым новым оборотом, и б) возрастание доли активных молекул фермента в исходной популяции.

Результаты, полученные в [33, 34], свидетельствуют о том, что в первом цикле оборота фермента принимает участие лишь незначительная часть молекул малатдегидрогеназы (около 0,1%), и эта часть активна с самого начала реакции.

Это типичное поведение гистерезисных ферментов, которые существуют в двух дискретных состояниях — активном и неактивном. В ходе реакции каждая активная молекула фермента, принимающая участие в акте химического превращения субстрата, выходит из равновесия с потенциально активными, но не реагирующими молекулами. Поэтому равновесие между двумя популяциями смещается, и доля активных молекул фермента возрастает с каждым оборотом, пока все молекулы фермента не станут активными.

#### Параметрический резонанс как возможный механизм действия сверхнизких концентраций биологически активных веществ на клеточном и субклеточном уровнях

Релаксационная концепция биокаталитических процессов позволила предложить возможное объяснение действия сверхмалых доз биологически активных агентов на некоторые внутриклеточные процессы [35].

Наблюдаемые зависимости эффективности действия биологически активного вещества от его концентрации приводят к предположению, что при достаточно низких концентрациях возникает некий параметрический резонанс. Он определяется временными параметрами запускаемых биологически активными веществами внутриклеточных процессов и характерным временем доставки вещества (или продукта его

взаимодействия с компонентами клетки) к специфическому месту внутри клетки (мембранный рецептор, активный или аллостерический центр фермента и т.п.).

Можно предположить, что при сверхнизких концентрациях вещества лимитирующей стадией всего процесса будет диффузия его молекул из объема к поверхности клетки. Тогда характерное время доставки вещества к атомному центру  $\tau$  можно определить как обратную величину числа столкновений  $Z$  молекул вещества с клеткой в единицу времени, т.е.  $\tau = Z^{-1}$ . Пренебрегая размерами низкомолекулярного биологически активного вещества по сравнению с размерами биомишени (клетки), значение  $Z$  можно рассчитать с помощью известного уравнения Смолуховского:

$$Z = 4\pi DRn \quad (6)$$

где  $D$  — коэффициент диффузии молекул биологически активного вещества;  $R$  — радиус клетки;  $n$  — число молекул в единице объема.

В качестве характерного временного параметра внутриклеточного процесса, ответственного за наблюдаемый эффект, естественно выбрать время конформационной релаксации макромолекулярных структур (ферментов, комплексов макромолекул, регуляторов биосинтеза, участков мембраны) после локального возмущения системы — присоединения субстрата, ингибитора или аллостерического лиганда к активному центру, редокс-изменения металла, ионизации кислотной группы и т.д. Для простоты дальнейшего изложения материала будем называть эту макромолекулярную структуру ферментом.

Итак, внешний агент — биологически активное вещество, поступающий в клетку со средней частотой  $Z$ , определяемой формулой (6), вызывает возникновение конформационно неравновесного состояния фермента, релаксирующего затем с характерным временем  $\tau$  к новому состоянию, равновесному для фермента с присоединенным агентом. На определенной стадии релаксации активность фермента экстремальна.

При очень малых концентрациях биологически активного вещества, когда  $Z^{-1} \gg \tau$ , почти весь фермент будет находиться в малоактивном исходном равновесном состоянии. При очень больших концентрациях вещества, когда  $Z^{-1} \ll \tau$ , почти весь фермент будет находиться в малоактивном конечном равновесном состоянии. Максимальную стационарную концентрацию активной неравновесной конформации можно ожидать в случае совпадения (по порядку величины) значений  $Z^{-1}$  и  $\tau$ . Для более строгого анализа необходимо знать положение активной конформации на кривой релаксации, истинную константу равновесия связывания биологически активного вещества с ферментом в разных состояниях при малых объеме и числе частиц [36] и другие параметры.

С помощью уравнения (6) легко рассчитать молярные концентрации вещества при заданном радиусе мишени, соответствующие условию  $Z^{-1} = \tau$ . Коэффициент диффузии  $D$  был выбран  $5 \cdot 10^{-10} \text{ м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$  (сахароза в воде). Тогда получаем

$$c \approx 3 \cdot 10^{-13} \tau^{-1} R^{-1} \quad (7)$$

где  $c$  — молярная концентрация вещества;  $\tau$  — время релаксации, с;  $R$  — радиус мишени, мкм.

Расчет показал, что для мишеней клеточных размеров ( $\sim 1$  мкм) можно ожидать появления экстремумов на концентрационной зависимости эффекта в интервале  $10^{-11}$ —

$10^{-15}$  М. Это совпадает с данными в работе [1], посвященной влиянию ряда органических пероксидов на рост числа клеток в культуре клеток табака.

Естественно, приведенные результаты могут служить лишь указанием на вероятность истинности предложенного подхода к объяснению механизма действия сверхмалых доз биологически активных веществ.

Альтернативный подход, основанный также на предположении о характере взаимодействия молекул веществ с внутриклеточными структурами по типу аллостерических эффектов, предложен в [7].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Богатыренко Е.Н., Редкозубова Г.П., Конрадов А.А. и др. Биофизика, 1989, т.34, с.327.
2. Бурлакова Е.Б., Греченко Е.Н., Соколов Е.Н., Терехова С.Ф. Там же, 1986, т.31, с.921.
3. Крутова Т.В. Там же, 1989, т. 34, с.1006.
4. Гладышева Т.В., Конрадов А.А., Лебедев К.А. Там же, 1989, т.34, с. 833.
5. Gick G.G. Zeitin F.N., Brazeau P. e. a. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, т.81, с.1553.
6. Хохлов А.П., Ярыгин К.Н., Бурлакова Е.Б. Биол. мембраны, 1989, т. 6, с.133.
7. Burlakova E.B., Konradov A.A., Khudyakov I.V. Nonlinear Biol., 1990, v.1, p.77
8. Блюменфельд Л.А. Проблемы биологической физики. М.: Наука, 1974, (2-е изд. - 1977).
9. Onsager L. Phys. Rev., 1931, v.37, p.405.
10. Onsager L. Ibid., 1931, v.38, p.2265.
11. Де Гроот С. Термодинамика необратимых процессов. М.: Издательство, 1956.
12. Воеводский В.В., Солодовников С.П., Чибрикин В.М. Докл.АН СССР, 1959, т.129, с. 1082.
13. Солодовников С.П. Ж. структ. химии, 1961, т.2, с.282.
14. Tuttle T., Weissman S.J. JACS, 1958, v.80 p.5342.
15. Бурштейн А.И. Докл.АН СССР, 1960, т. 135, с.886.
16. Александров И.В. Оптика и спектроскопия, 1960, т.9, с.679.
17. McConnell H.M. J. Chem. Phys., 1961, v. 34, p.1.
18. Воеводский В.В., Блюменфельд Л.А. Ж. Всес. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева, 1962, т. 7, с. 457.
19. Блюменфельд Л.А., Гольдманский В.И., Подгорецкий М.И., Чернавский Д.С. Ж. структ. химии, 1964, т. 8, с. 854.
20. Шилов А.Н. О сопряженных реакциях окисления. Москва, 1905.
21. Blumenfeld L.A. Physics of Bioenergetic Processes. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1983
22. Blumenfeld L.A., Tikhonov A.N. Biophysical Thermodynamics of Intracellular Processes. Molecular Machines of the Living Cell, Springer-Verlag: New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barselona, Budapest, 1994.
23. Гольдфельд М.Г., Дмитровский Л.Г., Блюменфельд Л.А. Биофизика, 1977, т. 22, с. 357.
24. Feinmann R.P. Phys. Rev., 1939, v. 56, p. 430.
25. Сидоренко Н.П., Дещеревский В.И. Биофизика, 1970, т. 15, с. 785.
26. Блюменфельд Л.А. Там же, 1971, т. 16, с. 724.
27. Блюменфельд Л.А. Там же, 1972, т. 17, с. 954.
28. Blumenfeld L.A. J. Theor. Biol., 1976, v. 58, p. 269.
29. Fain V.M. J. Chem. Phys., 1976, v. 65, p. 1854.
30. Колмогоров А.Н. Докл.АН СССР, 1954, т. 98, с. 527.
31. Arnold V.I., Avez A. Ergodic Problems of Classical Mechanics, 1968, Benjamin, N. Y.
32. Де Гроот С., Мазур П. Неравновесная термодинамика. М.: Мир, 1964.
33. Блюменфельд Л.А., Плешанов П.Г. Биофизика, 1986, т. 31, с. 760.
34. Блюменфельд Л.А., Плешанов П.Г. Там же, 1990, т. 35, с. 160.
35. Блюменфельд Л.А. Там же, 1993, т. 38, с. 129.
36. Blumenfeld L.A.; Grosberg A.Yu., Tikhonov A.N. J. Chem. Phys., 1991, v. 95, p. 7541.