ВЕСТНИК РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК, 2013, том 83, № 12, с. 1076–1082

С КАФЕДРЫ ПРЕЗИДИУМА РАН

DOI: 10.7868/S0869587313120050

В предлагаемой вниманию читателей статье, основанной на материалах доклада, заслушанного на одном из заседаний Президиума РАН, рассказывается об открытии неизвестного прежде фундаментального явления в области поведения высокоразбавленных водных растворов. Оно позволяет объяснить действие растворов биологически активных веществ не только при обычных, но и при низких и ультранизких концентрациях, а значит, открывает перспективы широкого использования этого явления в практических целях, в частности, в сфере производства и применения лекарственных средств.

ОБРАЗОВАНИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ АНСАМБЛЕЙ В ВЫСОКОРАЗБАВЛЕННЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

А.И. Коновалов

Шесть лет назад в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова (ИОФХ) РАН начались исследования эффектов, проявляемых высокоразбавленными водными растворами биологически активных веществ (БАВ). Эта тема разрабатывается в различных лабораториях мира [1], в том числе активно изучается в России в Институте биохимической физики им. Н.М. Эммануэля (ИБХФ) РАН [2, 3]. Сегодня считается, что активность растворов БАВ при низких и ультранизких концентрациях реализуется на всех уровнях биологической организации материи, то есть на уровне биомакромолекул, клеток, органов, организмов, популяций.

Приведём два примера, рассмотрев в качестве биоэффекта степень активации или степень ингибирования протеинкиназы С под действием растворов антиоксидантов в широкой области концентраций. В случае фенозана калия наряду с эффектом в области обычных концентраций (10^{-7} М) наблюдается эффект на уровне 10^{-18} М, а в случае альфа-токоферола наряду с эффектом при 10^{-5} М наблюдается эффект в области 10^{-15} М*.

КОНОВАЛОВ Александр Иванович – академик, советник РАН.

Подобные факты известны уже более 100 лет, но многие учёные не верят в существование самого́ явления активности растворов БАВ при низких концентрациях. Нельзя не признать, что до настоящего времени такое неверие было обоснованным, поскольку не существовало удовлетворительного физико-химического объяснения данного феномена, который таким образом оказывался как бы “вне закона”.

Большинство учёных, работавших в области биоэффектов при ультранизкой концентрации растворов, считали ответственными за их возникновение в двойной системе “биообъект–раствор” биообъекты. Пытаться объяснить описанное явление, исходя из свойств раствора, казалось абсурдным из-за того, что оно противоречило концепции бесконечно разбавленных растворов (при разбавлении растворы достаточно быстро приобретают свойства растворителей). Действительно, отношение числа молекул растворённого вещества к числу молекул воды при концентрации 10^{-8} М составляет 1 к 10^9, а при концентрации 10^{-18} М – 1 к 10^{18}. О каком влиянии растворённого вещества на свойства раствора может идти речь в подобных условиях? Поэтому делался вывод, что именно биообъекты по каким-то причинам способны реагировать на малое количество (фактически на отдельные молекулы) биологически активного вещества в растворе. По поводу того,

* Здесь приведены расчётные значения концентраций. Мы в своей работе придерживались такой же процедуры для возможности сопоставления с данными биологических исследований.

Перечень соединений, растворы которых изучались в широком интервале концентраций

№	Соединение	№	Соединение
1	Ихфан С-10	24	Нистатин
2	Ихфан С-8	25	β-Ситостерин
3	Калиевая соль фенозана	26	Стигмастерин
4	α-Токоферол	27	Тиролиберин гормон
5	Мелафен	28	β-Циклодекстрин
6	Салициловая кислота	29	Триэтиламмониевая соль 2-гидрокси-4-додецил-
7	Гуанибифос		2-оксо-6-хлорбензо[e]-1,2-оксафосфоринина
8	Йодид ацетилхолина	30	Холестерол
9	Аминобензойная кислота	31	Изониазид
10	Нитрат серебра	32	Стевиозид
11	Феназепам	33	Комплекс изониазид/стевиозид
12	Эстрон	34	Неонол
13	Тестостерон	35	24-эпибрассинолид
14	Натриевая соль 2-гидрокси-4-додецил-2-оксо-	36	Комплекс 24-эпибрассинолид/неонол
	6-хлорбензо[e]-1,2-оксафосфоринина	37	Ибупрофен
15	Мебикар	38	Лизин
16	Бромид цетилтриметиламмония	39–43	Производные гемина
17	Хлорид натрия	44–47	Катионные ПАВ
18	Пиридин-пиррольный макроцикл	48–52	Производные тиогликольурилов
19	Карбамид	53	Ванкомицин
20	Пектин	54–58	Производные резорцинаренов
21	Ацетилсалициловая кислота	59	Урацил
22	Глицин	60	Производное урацила
23	Аденин		

каким образом это происходит, существовали только предположения.

Приступая к исследованиям, мы, сотрудники Лаборатории физико-химии супрамолекулярных систем ИОФХ РАН, выбрали в качестве рабочей противоположную гипотезу, допустив, что ответственность за явление всё-таки несут растворы. Идея, которую необходимо было проверить, заключалась в следующем: возможно, при разных концентрациях растворённого вещества в растворах возникают различные состояния, различные молекулярные ансамбли, на которые и реагируют биообъекты.

Первоначально мы полагали, что такими ансамблями могут быть супрамолекулярные системы, и эта статья не появилась бы, если бы мы не работали в области химии супрамолекулярных систем. Но сегодня данное предположение поставлено под сомнение. Хочу отметить: в какой-то момент у нас возникло ощущение, что истинная причина того, почему обсуждаемое явление в течение долгого времени не получало объяснения, заключается в недостаточности наших знаний в области поведения растворов и их структурных характеристик. Достигнутые впоследствии результаты показали, что это действительно так.

В своей работе мы реализовали следующий подход: впервые предприняли масштабное и систематичное исследование растворов веществ разной химической природы в широком интервале концентраций при помощи целого набора различных физико-химических методов. Использование нескольких методов позволило добиться комплексности исследования. Это самым существенным образом повлияло на качество полученных результатов: в то время как один метод обычно не даёт ясной и чёткой картины изучаемых явлений, совокупность методов создаёт возможность прийти к достаточно определённым заключениям.

На первом этапе мы изучили 60 соединений в растворах с концентрациями от 10^{-2} до 10^{-20} М. В таблице представлен перечень исследованных соединений. Здесь есть антиоксиданты, регуляторы роста растений, нейромедиаторы, витамины, транквилизаторы, гормоны, другие лекарственные вещества, а также вещества, биологические свойства которых неизвестны. С химической точки зрения в этом перечне представлены соединения различного строения: от простых молекул (например, глицин – простейшая аминокислота) до сложных макроциклических соединений типа каликсаренов.

Первый принципиальный вывод, к которому мы пришли, изучая физико-химические свойства растворов, состоял в следующем: концепция бесконечно разбавленных растворов не универсальна! Все соединения по своему поведению в растворах разделились на две группы: растворы одних соединений соответствовали этой концепции, других – не соответствовали. Мы назвали соединения первого типа соединениями с "классическим" поведением растворов, соединения второго типа – соединениями с "неклассическим" поведением. При этом к "классическим" относится порядка 25% из числа изученных нами соединений, а 75% – ведут себя "неклассически".

"Классическое" поведение – это проявляющееся при последовательном разведении быстрое достижение раствором состояния растворителя и отсутствие дальнейшего изменения свойств раствора. На рисунке 1 представлен пример такого поведения. Поверхностное натяжение раствора достигает значения воды и дальше, начиная с концентрации 10^{-6} М, не изменяется. Значение электропроводности резко снижается при той же концентрации до значения, близкого к электропроводности воды, и продолжает дальше закономерно (линейно) снижаться. Однако растворы 75% исследуемых соединений вели себя неожиданным образом: их физико-химические свойства при разбавлении изменялись. Как показано на примере растворов фенозана калия (рис. 2), в данном случае поверхностное натяжение неожиданно снижается на 10–20 мН/м, а электропроводность вдруг достигает 40 мкСм/см. Всё это – за пределами ошибок эксперимента.

Сопоставление биоэффектов и физико-химических свойств растворов с изменением концентрации растворённого вещества привело к выводу, что и первые, и вторые являются результатом "неклассического" поведения! Это был второй важнейший вывод: необычные изменения биологической активности и физико-химических свойств растворов указанных соединений при разбавлении имеют общие причины. Ответ на вопрос о том, каковы эти причины, был получен в результате исследований растворов методом динамического светорассеяния, который даёт представление о размерах нанообъектов и их электрокинетическом потенциале (ζ-потенциал). Удалось установить, что в высокоразбавленных водных растворах с "неклассическим" поведением образуются наноразмерные (до 400 нм) молекулярные ансамбли, которые мы назвали "наноассоциатами".

На рисунке 3 показаны изменения средних гидродинамических диаметров нанообъектов в растворах при их последовательном разбавлении на примере четырёх соединений: мелафена, ихфана С-10, альфа-токоферола и фенозана калия. Казалось бы, картина неожиданная: никакой линейности или монотонности, изменения не закономерные, а скачкообразные. Электрокинетические потенциалы частиц изменяются также нелинейно (отметим, что в области высоких разбавлений их значения отрицательны). Но позднее нам удалось обнаружить, что эти изменения имеют вполне определённый смысл.

Сопоставление параметров наноассоциатов (то есть их размеров и значений ζ-потенциала) со свойствами растворов при изменении уровня концентрации растворённого вещества показывает, что между всеми величинами имеется поразительное соответствие. Эффекты работают симбатно: увеличению электропроводности соответствует увеличение отрицательных значений электрокинетического потенциала. Это указывает на закономерный, а не случайный характер таких изменений при определяющей роли параметров наноассоциатов. Значит, наноассоциаты "диктуют поведение" разбавленных растворов.

Тем не менее надо признать, что картина не всегда столь идеальна, а значит, наряду с ζ-потенциалом на электропроводность влияют и другие эффекты. Помимо взаимозависимости, выявленной между изменениями параметров наноассоциатов и физико-химическими свойствами растворов, аналогичное соответствие наблюдается и в отношении биологических свойств последних.

В итоге мы пришли к выводу, что в растворах с "неклассическим" поведением образуются наноассоциаты, и именно их образование является причиной такого поведения, поскольку наличие этих молекулярных ансамблей – то единственное, что на структурном уровне отличает "классические" растворы от "неклассических".

Исходя из имеющихся данных, следует предположить, что для образования наноассоциатов само растворённое вещество должно обладать определённой структурой. Однако сегодня мы ещё не знаем, какие структурные особенности обусловливают возникновение наноассоциатов. Но существенно то, что растворённое вещество требуется обязательно: в холостых экспериментах (без присутствия в растворе растворённого вещества), в которых воспроизводилась система последовательных разбавлений (воду разбавляли

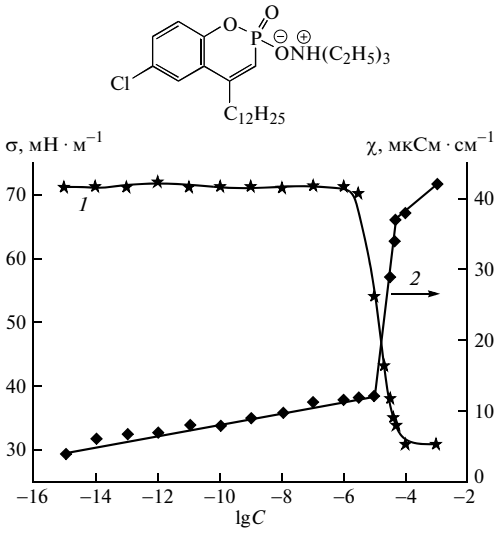

Рис. 1. Концентрационная зависимость поверхностного натяжения (*1*) и удельной электропроводности (*2*) водных растворов триэтиламмониевой соли 2-гидрокси-4-додецил-2-оксо-6-хлорбензо[е]-1,2-оксафосфоринина, 25°С

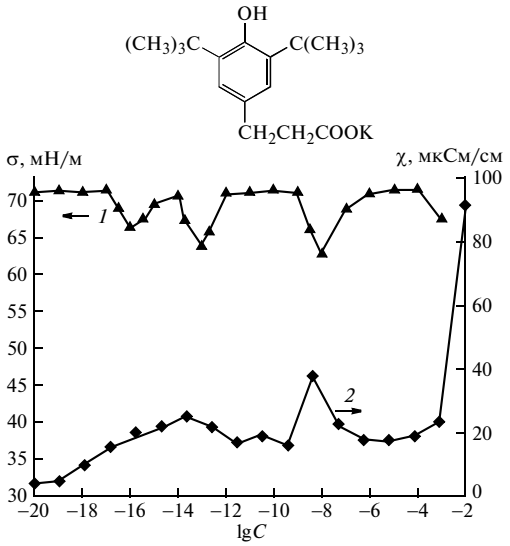

Рис. 2. Концентрационная зависимость поверхностного натяжения (*1*) и удельной электропроводности (*2*) водных растворов калиевой соли фенозана, 25°С

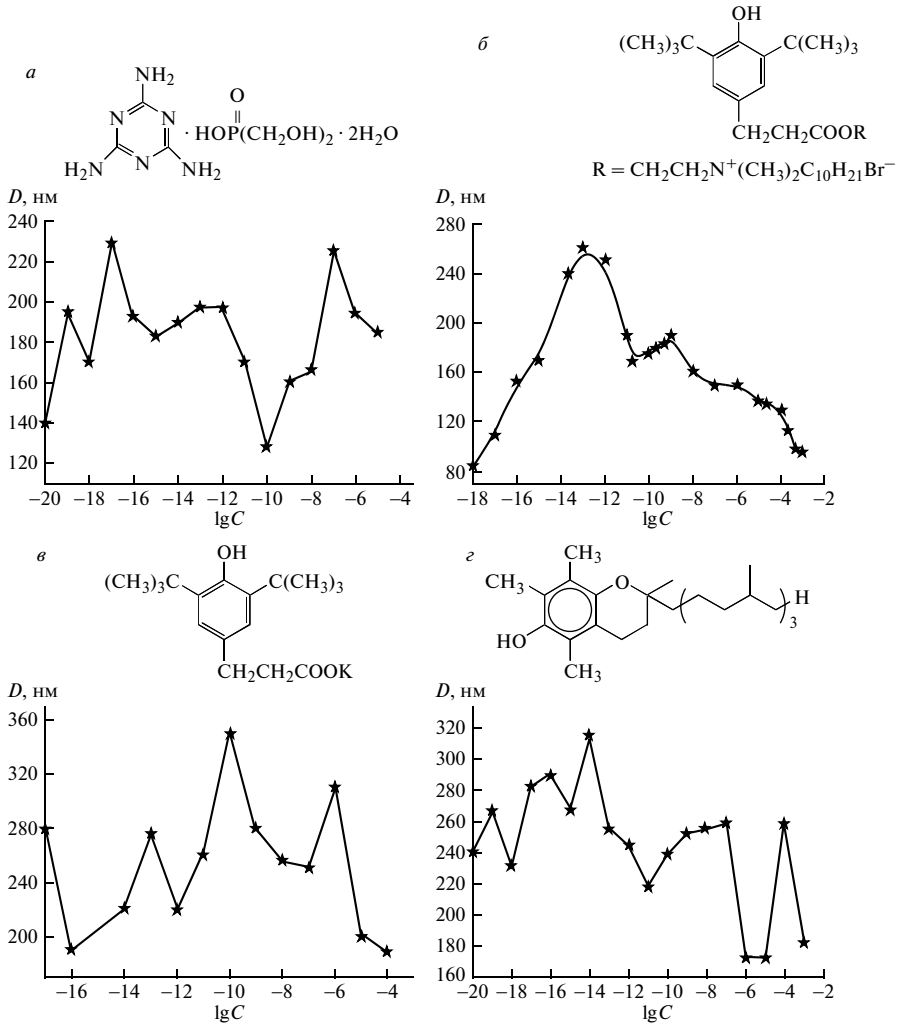

Рис. 3. Концентрационные зависимости размеров (D) наноассоциатов, образующихся в растворах мелафена (*а*), ихфана С-10 (*б*), фенозана калия (*в*), α-токоферола (*г*)

водой), образование наноассоциатов не было зафиксировано [4–8].

В ходе экспериментов мы встретились с ещё одной существенной неожиданностью: для образования наноассоциатов необходимы внешние электромагнитные поля. Мы установили это с помощью пермаллоевого контейнера, который экранирует свою внутреннюю полость от внешних электромагнитных полей. Характеристика пермаллоевого контейнера такова: индукция геомагнитного поля снижается внутри контейнера более чем в тысячу раз. Эксперименты проводили следующим образом. Мы готовили растворы и делили их на две части при каждом измерении. Один образец оставляли, как обычно, на столе – эту серию назвали "лабораторный стол", другой помещали в пермаллоевый контейнер – серия "пермаллоевый контейнер". Результаты оказались разные: на лабораторном столе данные по размерам наноассоциатов достоверны до 10^{-16} М, а в пермаллоевом боксе только до 10^{-7} М. Никаких наноассоциатов в пермаллоевом контейнере в области высокоразбавленных растворов нет. Следовательно, необходимым условием их образования является внешнее электромагнитное поле. Очень интересные результаты дало сопоставление этих данных с данными по физико-химическим свойствам растворов. В растворах, выдержанных в пермаллоевом боксе, произошли принципиальные изменения. Например, электропроводность раствора, начиная с 10^{-6} М, соответствует электропроводности воды и только воды. Это подтверждает сделанный вывод об отсутствии наноассоциатов в пермаллоевом боксе в области высокоразбавленных растворов, доказывая, что полученные данные отражают закономерность, а не являются следствием какой-то методической ошибки. В целом можно утверждать, что в растворах, выдержанных в пермаллоевом контейнере, наблюдается трансформация "неклассического" поведения в "классическое", так как наноассоциаты при отсутствии электромагнитного поля не образуются [9–11].

На рисунке 4 сопоставляются результаты серий "лабораторный стол" и "пермаллоевый контейнер" для ряда соединений (здесь данные только по размерам), и во всех случаях имеется некая пограничная концентрация, продолжающаяся областью значений, при которых в серии "пермаллоевый контейнер" наноассоциаты не образуются. Эта область соответствует тому уровню концентраций, при которых в обычных условиях проявляются биоэффекты. Основываясь на этих показателях, мы выдвинули ещё одно предположение. Согласно ему, в отсутствии наноассоциатов не должно быть и биоэффектов.

По нашему предложению сотрудники ИБХФ РАН Е.Л. Мальцева, В.В. Каспаров и Н.П. Пальмина проверили эту гипотезу. Они исследовали изменение микровязкости липидной компоненты соответствующих мембран под влиянием растворов фенозана калия в условиях "лабораторный стол" и "пермаллоевый контейнер" и сопоставили полученные результаты. Было установлено, что в условиях "лабораторный стол" эффекты проявляются при трёх концентрациях – 10^{-6}, 10^{-12}, 10^{-15} М. В условиях "пермаллоевый контейнер" эффект сохранился только в области 10^{-6} М, а при двух других значениях концентрации – исчез. Сравнение этих результатов с данными наших экспериментов с растворами фенозана калия (рис. 5) позволяет выделить интересные особенности и сделать два важных вывода. Итак, биоэффекту при 10^{-6} М на размерной зависимости отвечает максимум. Как биоэффект, так и соответствующие ему частицы в условиях "пермаллоевый контейнер" сохраняются. Биоэффектам при 10^{-12}, 10^{-15} М на размерной зависимости отвечают минимумы. И те и другие в условиях "пермаллоевый контейнер" исчезают.

Отсюда первый вывод: природа эффектов, появляющихся при 10^{-6} М, и эффектов, возникающих в обычных условиях при концентрациях 10^{-12}, 10^{-15} М, различна. Причину таких различий предстоит выяснить.

Второй вывод: в условиях "пермаллоевый контейнер", то есть в отсутствии электромагнитного поля, в высокоразбавленных водных растворах не образуются наноассоциаты и, как следствие этого, отсутствуют биоэффекты.

Интересный эксперимент, демонстрирующий роль электромагнитного поля при образовании наноассоциатов, был осуществлён с участием Д.А. Коновалова (Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского РАН) на примере раствора бромида цетилтриметиламмония (БЦТА). В обычных условиях в растворе при концентрации БЦТА, равной 10^{-9} М, образуются наноассоциаты размером порядка 240 нм. В гипоэлектромагнитных условиях (контейнер) наноассоциаты не образуются. Однако если внутри контейнера генерировать электромагнитное поле 7 Hz, то в растворе возникают наноассоциаты приблизительно того же размера, что и при обычных условиях.

Исследования растворов БЦТА показали каталитический эффект наноассоциатов в биомиметической реакции гидролиза эфиров фосфорных кислот и проявление растворами с концентрацией 10^{-7} М оптической активности (последнее исследование – с участием А.П. Тимошевой). Оба явления отсутствуют в условиях "пермаллоевый контейнер" [11]. Таким образом, зависимость электромагнитное поле–наноассоциаты–биоэффекты в описанных экспериментах сохраняется.

Проведённые исследования позволяют заключить: образование наноассоциатов – ключ к пониманию поведения высокоразбавленных водных растворов. Но что нам известно о наноассоциатах, каков их состав? Оценки показывают, что

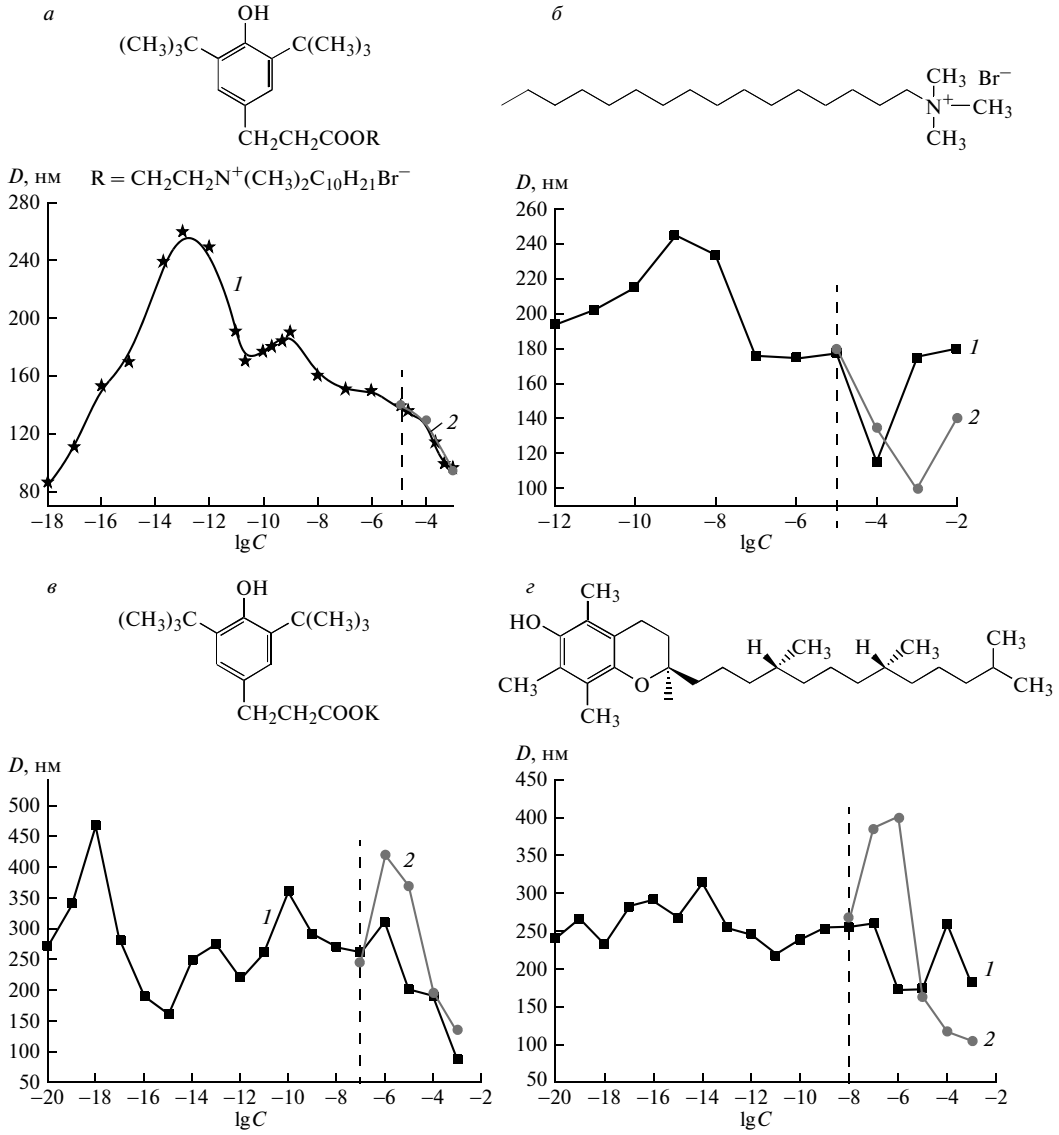

Рис. 4. Концентрационные зависимости размеров (D) наноассоциатов, образующихся в растворах ихфана С-10 (*а*), бромида цетилтриметиламмония (*б*), фенозана калия (*в*), α-токоферола (*г*) в нормальных (*1*) и гипоэлектромагнитных (*2*) условиях

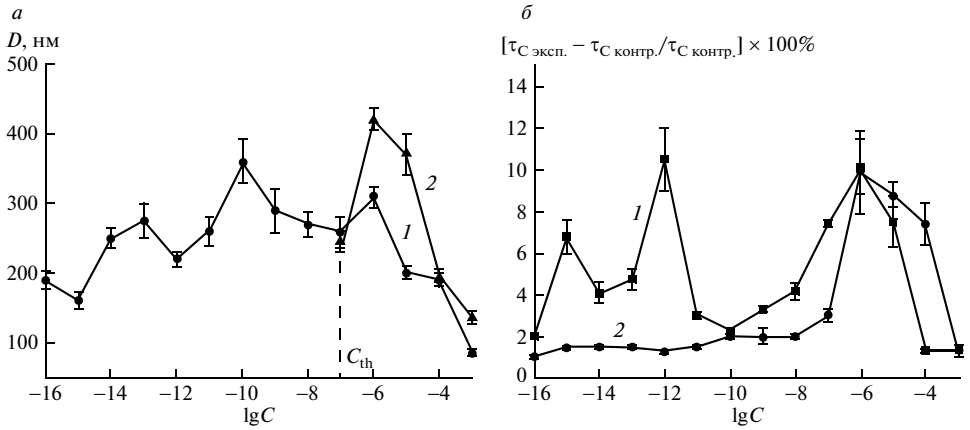

Рис. 5. Концентрационные зависимости изменения размера (D) наноассоциатов, образующихся в растворах фенозана калия (*а*), и микровязкости липидного бислоя синаптосом (*б*) при использовании разбавленных растворов фенозана калия, приготовленных в обычных условиях (*1*) и выдержанных в пермаллоевом контейнере (*2*) в течение 24 ч

количества молекул растворённого вещества при рассматриваемых концентрациях недостаточно, чтобы образовались наноассоциаты наблюдаемых размеров. Следовательно, основную часть наноассоциатов в высокоразбавленных растворах составляют молекулы воды. При этом надо иметь в виду, что нанообъекту размером в 100 нм соответствуют около 7 миллионов молекул воды.

Какова природа наноассоциатов, мы в настоящее время точно не знаем, как и природу сил, способных удерживать вместе миллионы молекул. Ведь учитывая кубическую зависимость числа молекул воды в наноассоциате от его диаметра соотношение будет следующим: 100 нм – ~7 млн., 200 нм – ~50 млн., 300 нм – ~200 млн., 400 нм – ~500 млн. Неясным остаётся и состояние материи, которое реализуется под влиянием растворённых веществ и электромагнитных полей, по крайней мере, в высокоразбавленных водных растворах.

Тем не менее наличие вопросов не отменяет того, что нами открыто неизвестное ранее фундаментальное явление: образование в высокоразбавленных водных растворах под влиянием растворённого вещества и внешних электромагнитных полей молекулярных ансамблей – наноассоциатов. Именно образование наноассоциатов определяет всю совокупность свойств – и физико-химических, и биологических – этих высокоразбавленных водных растворов.

Безусловно, наши исследования и упомянутые исследования наших коллег из других институтов – только первый шаг на пути понимания механизмов поведения высокоразбавленных растворов БАВ. Помимо широкой проблемы изучения природы наноассоциатов в дальнейшем необходимо приступить к поиску ответов на следующие вопросы:

• что и почему происходит с наноассоциатами при последовательном разведении растворов?

• каков механизм влияния высокоразбавленных растворов на биообъекты?

• что именно влияет на биообъекты: непосредственно наноассоциаты или раствор, структурированный наноассоциатами?

• существуют ли наноассоциаты в биообъектах? если да, то какова их роль и механизм действия?

• какова взаимосвязь между структурой молекул растворённого вещества и образованием наноассоциатов?

Нам представляется, что полученные результаты – это вызов физикам, биологам, биофизикам и в меньшей, наверное, степени химикам, хотя, несомненно, обширное поле деятельности для последних формирует задача установления взаимосвязи между структурой молекулы и образованием наноассоциатов. Но в целом требуется скоординированная работа учёных всех указанных областей науки.

Выражаю глубокую благодарность основным исполнителям работ по изучению высокоразбавленных растворов биологически активных веществ сотрудникам ИОФХ РАН И.С. Рыжкиной, Л.И. Муртазиной, Ю.В. Киселёвой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hormesis: a revolution in biology, toxicology and medicine. 1st ed. N.Y.: Springer, 2009.
2. *Пальмина Н.П., Мальцева Е.Л., Пынзарь Е.И., Бурлакова Е.Б.* Модификация активности протеинкиназы С лигандами в сверхмалых концентрациях. Роль протеинкиназы С и её эффекторов в процессах пероксидного окисления // Российский химический журнал. 1999. № 5.
3. *Бурлакова Е.Б, Конрадов А.А., Мальцева Е.Л.* Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов // Химическая физика. 2003. № 2.
4. *Рыжкина И.С., Муртазина Л.И., Киселёва Ю.В., Коновалов А.И.* Свойства супрамолекулярных наноассоциатов, образующихся в водных растворах низких и сверхнизких концентраций биологически активных веществ // Доклады АН. 2009. № 4.
5. *Пальмина Н.П., Часовская Т.Е., Рыжкина И.С. и др.* Водные растворы фенозана калия: влияние на структуру биологических мембран и электропроводность // Доклады АН. 2009. № 1.
6. *Рыжкина И.С., Муртазина Л.И., Шерман Е.Д. и др.* Водные растворы макроциклического пиридинпиррольного соединения низких концентраций: взаимосвязь параметров супрамолекулярных наноразмерных ассоциатов, физико-химических свойств и физиологической активности // Доклады АН. 2010. № 5.
7. *Рыжкина И.С., Муртазина Л.И., Шерман Е.Д. и др.* Физико-химическое обоснование горметического отклика биосистемы очистки сточных вод на действие растворов N,N-дифенилгуанидиновой соли дигидроксиметилфосфиновой кислоты // Доклады АН. 2011. № 2.
8. *Рыжкина И.С., Киселёва Ю.В., Муртазина Л.И. и др.* Влияние концентраций α-токоферола на самоорганизацию, физико-химические свойства растворов и структуру биологических мембран // Доклады АН. 2011. № 5.
9. *Рыжкина И.С., Муртазина Л.И., Коновалов А.И.* Действие внешнего электромагнитного поля – условие образования наноассоциатов в высокоразбавленных водных растворах // Доклады АН. 2011. № 6.
10. *Рыжкина И.С., Киселева Ю.В., Муртазина Л.И., Коновалов А.И.* Эффект ультранизких концентраций и электромагнитных полей // Доклады АН. 2012. № 3.
11. *Рыжкина И.С., Киселева Ю.В., Тимошева А.П. и др.* Водные растворы амфифильного производного каликс[4] резорцинарена низких концентраций: самоорганизация, физико-химические свойства и биологическая активность в нормальных и гипоэлектромагнитных условиях // Доклады АН. 2012. № 1.