М. В. ВОЛЬКЕНШТЕЙН

БИОФИЗИКА

ВТОРОЕ ИЗДАНИЕ,
ПЕРЕРАБОТАННОЕ И ДОПОЛНЕННОЕ

МОСКВА «НАУКА»
ГЛАВНАЯ РЕДАКЦИЯ
ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
1988

ББК 28.071
В71
УДК 577.32(075.8)

Рекомендовано Министерством высшего и среднего специального образования СССР для использования в учебном процессе студентами, специализирующимися в области биофизики и физико-химической биологии

ВОЛЬКЕНШТЕЙН М. В. Биофизика: Учеб. руководство, 2-е изд., перераб. и доп.— М.: Наука. Гл. ред. физ.-мат. лит., 1988.— 592 с., ил.
ISBN 5-02-013835-5

Энциклопедический курс, излагающий основные разделы предмета — молекулярную биофизику, биофизику клетки и биофизику сложных систем, включая проблемы биологической эволюции. Второе издание переработано по сравнению с первым, вышедшим в 1981 г., и дополнено новыми разделами (бионеорганическая химия и биофизика, топология ДНК, акустическая рецепция, биолюминесценция и др.).

Для студентов — биологов и физиков, специализирующихся в области биофизики и физико-химической биологии.

Табл. 44. Ил. 332. Библиогр. 83 назв.

Рецензенты:
кафедра биофизики биологического факультета ЛГУ,
зав. кафедрой кандидат биологических наук *А. В. Лонский*,
доктор химических наук *Л. А. Блюменфельд*

В $\frac{2001040000-034}{053(02)-88}$ 133-88

© Издательство «Наука».
Главная редакция
физико-математической литературы,
1981; с изменениями, 1988

ISBN 5-02-013835-5

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие ко второму изданию 7

Предисловие к первому изданию 7

Глава 1. Задачи и методы биофизики 9

§ 1.1. Место биофизики в естествознании 9
§ 1.2. Физика и биология 10
§ 1.3. Живая и неживая природа 13
§ 1.4. Биологическая индивидуальность 14
§ 1.5. Финализм и каузальность 15
§ 1.6. Свойства открытых систем 16
§ 1.7. Разделы и методы биофизики 20

Глава 2. Химические основы биофизики 23

§ 2.1. Химия и биология 23
§ 2.2. Аминокислоты 25
§ 2.3. Электролиты 27
§ 2.4. Состав и первичная структура белков 32
§ 2.5. Нуклеиновые кислоты 36
§ 2.6. Аденилаты 40
§ 2.7. Хиральность биологических молекул 42
§ 2.8. Углеводы и липиды 46
§ 2.9. Кофакторы, витамины, гормоны 48
§ 2.10. Основные биохимические процессы 52
§ 2.11. Сильные и слабые взаимодействия 54

Глава 3. Физика макромолекул 59

§ 3.1. Макромолекулы и высокоэластичность 59
§ 3.2. Внутреннее вращение и поворотная изомерия 62
§ 3.3. Конформационная теория макромолекул 67
§ 3.4. Макромолекула как кооперативная система 73
§ 3.5. Клубок и глобула 76
§ 3.6. Методы исследования макромолекул 79
§ 3.7. Полиэлектролиты 84

Глава 4. Физика белка 87

§ 4.1. Задачи физики белка 87
§ 4.2. Конформации полипептидной цепи 88
§ 4.3. Водородная связь и структура воды 94
§ 4.4. Переходы спираль — клубок 99
§ 4.5. Белковая глобула и гидрофобные взаимодействия . . . 104
§ 4.6. Связь между первичной и пространственной структурами белка 108
§ 4.7. Структура и устойчивость глобулы 112
§ 4.8. Антитела и антигены 122
§ 4.9. Фибриллярные белки 126

Глава 5. Методы исследования структуры биополимеров . . . 130

§ 5.1. Рентгеноструктурный анализ 130
§ 5.2. Диффузное рассеяние рентгеновских лучей растворами биополимеров 136
§ 5.3. Методы ядерной физики 138
§ 5.4. Электронные спектры поглощения 140
§ 5.5. Люминесценция 144
§ 5.6. Естественная оптическая активность 148
§ 5.7. Естественная оптическая активность биополимеров . . . 154
§ 5.8. Магнитная оптическая активность 159
§ 5.9. Колебательные спектры 163
§ 5.10. Спектры ядерного и электронного парамагнитного резонанса 166

Глава 6. Физика ферментов 173

§ 6.1. Химическая кинетика и катализ 173
§ 6.2. Кинетика простых ферментативных реакций 177
§ 6.3. Химические аспекты действия ферментов 182
§ 6.4. Конформационные свойства ферментов 189
§ 6.5. Физика фермент-субстратного взаимодействия 192
§ 6.6. Электронно-конформационные взаимодействия 195
§ 6.7. Кооперативные свойства ферментов 199
§ 6.8. Миоглобин и гемоглобин 206
§ 6.9. Бионеорганическая химия и биофизика 215

Глава 7. Физика нуклеиновых кислот 220

§ 7.1. Молекулярная биология и физика 220
§ 7.2. Структура нуклеиновых кислот 222
§ 7.3. Внутримолекулярные взаимодействия в двойной спирали 231
§ 7.4. Термодинамика плавления двойной спирали 233
§ 7.5. Кинетика расплетания двойной спирали 242
§ 7.6. Взаимодействие двойной спирали с малыми молекулами и ионами 246
§ 7.7. Редупликация ДНК 248
§ 7.8. Топология ДНК 254

Глава 8. Физика биосинтеза белка 258

§ 8.1. Проблема генетического кода 258
§ 8.2. Биосинтез белка 262
§ 8.3. Транскрипция и обратная транскрипция 266
§ 8.4. Транспортные РНК 269
§ 8.5. Трансляция 272
§ 8.6. Расшифровка генетического кода и его смысл 276
§ 8.7. Мутации 282
§ 8.8. Регуляция генов 287

Глава 9. Неравновесная термодинамика в биологии 301

§ 9.1. Информация и энтропия 301
§ 9.2. Неравновесные процессы 307
§ 9.3. Сопряжение потоков 310
§ 9.4. Сопряжение химических реакций 312
§ 9.5. Стационарные состояния линейных систем 316
§ 9.6. Сопряжение химических реакций с переносом вещества 322
§ 9.7. Процессы, далекие от равновесия 326

Глава 10. Физика мембран 332

§ 10.1. Мембраны клетки 332
§ 10.2. Структура мембран 334
§ 10.3. Конформационные свойства мембран 337

§ 10.4. Пассивный мембранный транспорт 341
§ 10.5. Активный мембранный транспорт 345
§ 10.6. Перенос заряженных частиц через мембраны 351
§ 10.7. Молекулярная рецепция 354

Глава 11. Физика нервного импульса 359

§ 11.1. Аксон и нервный импульс 359
§ 11.2. Распространение нервного импульса 369
§ 11.3. Генерация импульса 374
§ 11.4. Ионные каналы 378
§ 11.5. Синаптическая передача 382

Глава 12. Механохимические процессы 387

§ 12.1. Термодинамика механохимических процессов 387
§ 12.2. Структура мышцы и мышечных белков 392
§ 12.3. Химия и физика мышцы 397
§ 12.4. Теория мышечного сокращения 402
§ 12.5. Кинетические свойства мышцы 409
§ 12.6. Механохимические системы 411
§ 12.7. Слуховая рецепция 416
§ 12.8. Биомеханика 420

Глава 13. Биоэнергетика дыхательной цепи 423

§ 13.1. Биологическое окисление 423
§ 13.2. Строение и свойства митохондрий 429
§ 13.3. Хемиосмотическое сопряжение 432
§ 13.4. Электронно-конформационные взаимодействия 439
§ 13.5. Цитохром *c* 444

Глава 14. Фотобиологические процессы 447

§ 14.1. Фотосинтез 447
§ 14.2. Две фотохимические системы 452
§ 14.3. Хлоропласты 458
§ 14.4. Механизм фотосинтеза 460
§ 14.5. Зрение 462
§ 14.6. Молекулярный механизм фоторецепции 470
§ 14.7. Бактериородопсин 477
§ 14.8. Биолюминесценция 480

Глава 15. Моделирование динамических биологических процессов 483

§ 15.1. Динамическая упорядоченность 483
§ 15.2. Физико-математические основы динамики нелинейных процессов 486
§ 15.3. Модели Лотка и Вольтерра 494
§ 15.4. Автокаталитические системы 499
§ 15.5. Фазовые переходы 505
§ 15.6. Стохастические процессы 509
§ 15.7. Динамика и регуляция 511

Глава 16. Периодические химические и биологические процессы 514

§ 16.1. Введение 514
§ 16.2. Реакции Белоусова — Жаботинского 515
§ 16.3. Автоколебания при гликолизе 522
§ 16.4. Нелинейная динамика мембран 525
§ 16.5. Автоволновые процессы в сердечной мышце 528

Глава 17. Проблемы биологического развития 534

§ 17.1. Происхождение жизни 534
§ 17.2. Моделирование добиологической эволюции 538

§ 17.3. Игровые модели и информационные аспекты самоорганизации 541
§ 17.4. Гинерциклы 544
§ 17.5. Другие модели добиологической эволюции 548
§ 17.6. Биологическая эволюция 553
§ 17.7. Эволюция биологических макромолекул 558
§ 17.8. Информационные аспекты эволюции 561
§ 17.9. Сложность и эволюция 568
§ 17.10. Онтогенез 573
§ 17.11. Иммунитет 578

Список рекомендуемой литературы 583

Предметный указатель 587

ПРЕДИСЛОВИЕ КО ВТОРОМУ ИЗДАНИЮ

Необходимость второго, дополненного и переработанного издания «Биофизики» определяется несколькими причинами.

В первом издании отсутствовал ряд разделов биофизики, таких как топология ДНК, вопросы бионеорганической химии, акустическая рецепция, биолюминесценция и др. Эти разделы нужны в курсе, претендующем до некоторой степени на энциклопедичность.

За истекшие годы биофизические исследования значительно расширились и продвинулись вперед по ряду актуальных направлений. В этом издании предпринята попытка отразить достигнутый уровень науки, в книгу включены новейшие результаты, в том числе и полученные автором и его сотрудниками. Современная биофизика содержит представления, развитые в синергетике и в теории информации, что также нашло свое отражение в книге.

И, наконец, существует очевидная потребность в учебном пособии по биофизике — первое издание книги давно распродано.

Я очень благодарен Б. Н. Белинцеву, Л. А. Блюменфельду, В. Д. Васильеву, Г. В. Гурскому, В. Б. Журкину, В. И. Иванову, А. А. Константинову, В. П. Тимофееву, А. Н. Тихонову и Е. Е. Фесенко за их советы и материалы, оказавшиеся очень полезными для работы над вторым изданием.

ПРЕДИСЛОВИЕ К ПЕРВОМУ ИЗДАНИЮ

Задача этой книги — служить учебным пособием для студентов физических и биологических факультетов, специализирующихся в области биофизики.

Книга исходит из двух монографий автора («Молекулярная биофизика», 1975 и «Общая биофизика», 1978), но написана заново. В основу положен курс, читаемый на протяжении многих лет студентам Московского физико-технического института.

Биофизика рассматривается в книге как физика живой природы, а не как вспомогательный раздел биологии и физиологии. Сегодня биофизика неразрывно связана с теоретической биоло-

гией. Соответственно в книге уделяется внимание основным проблемам поведения биологических систем на разных уровнях строения, начиная с молекулярного. Рассматриваются также физические аспекты проблем генетики, биологии развития, эволюционной биологии.

В книге излагаются, главным образом, теоретические основы биофизики. Одновременно уделено надлежащее внимание важнейшим экспериментальным фактам. Рассмотрена не только теория биологических явлений, о которых идет речь, но и теория ряда применяемых в биофизике методов исследования.

Несмотря на большой объем книги, в нее не вошли многие вопросы, относящиеся к ряду областей физиологии, к инструментальным и математическим методам прикладной биофизики. Между физиологией и биофизикой нет резкой границы. Тем не менее предпринята попытка разделить эти дисциплины, сосредоточив главное внимание на наиболее общих вопросах. Равным образом, в книге никак не представлена радиобиология. Физика ряда физиологических процессов, радиобиология, биомеханика требуют специального изложения и выходят за пределы этого пособия.

Некоторые физико-математические разделы, предназначенные, главным образом, для физиков, напечатаны мелким шрифтом.

Я надеюсь, что эта книга окажется полезной не только для студентов, но и для научных работников и аспирантов, биологов, физиков и химиков, знакомящихся с биофизикой.

Книга написана по предложению Научного Совета по проблемам биологической физики Академии наук СССР. Я глубоко признателен Совету и, прежде всего, Г. Р. Иваницкому за постоянную помощь в создании книги. Я очень благодарен также Л. А. Блюменфельду и А. Б. Рубину за множество ценных замечаний, сделанных ими при чтении рукописи.

Глава 1

ЗАДАЧИ И МЕТОДЫ БИОФИЗИКИ

§ 1.1. Место биофизики в естествознании

Будем исходить из определения физики как науки, изучающей строение и свойства конкретных видов материи — веществ и полей — и формы существования материи — пространство и время. В этом определении нет разграничения живой и неживой природы. Приведенное определение не означает сведения всего естествознания к физике, но из него следует, что конечные теоретические основы любой области естествознания имеют физический характер. Эти основы уже раскрыты в химии, мы знаем сейчас, что химия изучает структуру и изменения электронных оболочек атомов и молекул при их взаимодействии. Соответственно теоретическая химия сегодня полностью основана на квантовой и статистической механике, на термодинамике и физической кинетике.

Биология есть наука о живой природе, объекты которой неизмеримо сложнее неживых. Поэтому предстоит пройти еще долгий путь, прежде чем удастся раскрыть сколько-нибудь полно глубинные физические основы биологических явлений и закономерностей.

Исходя из сказанного, определим биологическую физику как физику явлений жизни, изучаемых на всех уровнях, начиная с молекул и клеток и кончая биосферой в целом. Такое определение биофизики противостоит ее пониманию как вспомогательной области биологии или физиологии. Содержание биофизики не обязательно связано с применением физических приборов в биологическом эксперименте. Медицинский термометр, электрокардиограф, микроскоп — физические приборы, но врачи или биологи, пользующиеся этими приборами, вовсе не занимаются биофизикой. Биофизическое исследование начинается с физической постановки задачи, относящейся к живой природе. Это означает, что такая задача формулируется, исходя из общих законов физики и атомно-молекулярного строения вещества.

Тем самым конечная цель биофизики состоит в обосновании теоретической биологии. Одновременно биофизика решает многочисленные теоретические и практические (прикладные) проблемы более частного характера.

Формулировка биофизической задачи возможна пока лишь в ограниченном числе случаев. Живая природа настолько сложна, что биологические знания большей частью недостаточны для реа-

лизации физических подходов. Однако биология стремительно развивается, с ее современным развитием неразрывно связано развитие биофизики.

Биофизика — наука XX века. Из этого не следует, что ранее не решались биофизические задачи. Максвелл построил теорию цветного зрения, Гельмгольц измерил скорость распространения нервного импульса. Число примеров такого рода велико. Однако лишь в наше время биофизика перешла от изучения физических свойств организмов и физических воздействий на них (свет, звук, электричество) к фундаментальным проблемам — к исследованию наследственности и изменчивости, онтогенеза и филогенеза, метаболизма и биоэнергетики. Это оказалось возможным именно благодаря мощному развитию биологии и биохимии.

Задачи биофизики те же, что и биологии. Они состоят в познании явлений жизни. Будучи частью физики, биофизика неотделима от биологии. Биофизик должен обладать и физическими, и биологическими знаниями. Для успешной работы в области биофизики желательно общее понимание живой природы, определяемое знанием основ зоологии и ботаники, физиологии и экологии. Физики часто относятся пренебрежительно к описательным разделам биологии. Необходимость зоологии и ботаники принципиальна, без Линнея не могло бы возникнуть учение Дарвина.

Несмотря на большие трудности, современная биофизика достигла крупных успехов в объяснении ряда биологических явлений. Мы узнали многое о строении и свойствах биологически функциональных молекул, о свойствах и механизмах действия клеточных структур, таких, как мембраны, биоэнергетические органоиды, механохимические системы. Успешно разрабатываются физико-математические модели биологических процессов, вплоть до онтогенеза и филогенеза. Реализованы общетеоретические подходы к явлениям жизни, основанные на термодинамике, теории информации, теории автоматического регулирования. Все эти вопросы будут с той или иной степенью детализации рассмотрены в книге. При этом, в соответствии с пониманием биофизики как физики явлений жизни, мы будем исходить из физических закономерностей, а не из физиологической классификации. Так, например, рецепция внешних воздействий органами чувств рассматривается в различных разделах книги — зрение в главе, посвященной фотобиологическим явлениям, слух и осязание в связи с механохимическими процессами, обоняние — в связи с физикой молекулярного узнавания.

§ 1.2. Физика и биология

Но достаточна ли современная физика для решения биологических проблем, для обоснования теоретической биологии? Не потребуется ли биофизике новая, еще не существующая физика? В истории науки были ситуации, в которых ранее разработанная

теория встречалась с границами своей применимости и оказывалось необходимым строить принципиально новую систему представлений. Именно так возникли и теория относительности, и квантовая механика. *A priori* не исключено, что подлинная биофизика должна быть построена на основе еще не известной будущей физики, существенно отличной от современной.

Оставим в стороне концепции *витализма*, согласно которым биологические явления принципиально непостижимы на основе физики и химии, так как существует некая «жизненная сила», или энтелехия, или биологическое поле, не подлежащие физическому истолкованию. Витализм не научен, он отрицает единство природы и, в конечном счете, приходит к теологии. В современной науке неконструктивные виталистические представления уже не фигурируют.

Обсуждая возможности физического истолкования явлений жизни, т. е. влияние физики на современное и последующее развитие биологии, не следует забывать и об обратном влиянии биологии на физику. Закон сохранения энергии, первое начало термодинамики, был открыт Майером, Джоулем и Гельмгольцем. Как известно, Майер исходил из наблюдений над живыми организмами, над людьми. Менее известно, что Гельмгольц также основывался на биологических явлениях, руководствуясь четкой антивиталистической концепцией. Он писал: «По Шталю, силы, действующие в живом теле, суть физические и химические силы органов и веществ, но какая-то присущая телу жизненная душа или жизненная сила может связывать или освобождать их деятельность... Я нашел, что теория Шталя приписывает всякому живому телу свойства так называемого *perpetuum mobile* (вечного двигателя)... Таким образом я натолкнулся на вопрос, какие отношения должны существовать между различными силами природы, если принять, что *perpetuum mobile* вообще невозможен...». Не только биофизика, но и физика в целом развивались на пути преодоления витализма.

Остановимся на представлениях о соотношении физики и биологии, разработанных физиками XX века — Бором и Шредингером.

Бор рассматривал эту проблему на основе концепции *дополнительности*, частным случаем которой является принцип неопределенности квантовой механики. Бор считал дополнительными исследования живых организмов на атомно-молекулярном уровне и как целостных систем. Эти два вида исследований несовместимы. В то же время «ни один результат биологического исследования не может быть однозначно описан иначе как на основе понятий физики и химии». Жизнь следует рассматривать «...как основной постулат биологии, не поддающийся дальнейшему анализу», подобно кванту действия в атомной физике. Таким образом, имеется дополнительность биологии, с одной стороны, и физики и химии — с другой. Эта концепция не виталистична, она

не ставит каких-либо границ применению физики и химии в исследованиях живой природы.

В конце жизни (1961, 1962 гг.) Бор изменил свои взгляды под влиянием успехов молекулярной биологии. Он отметил, что дополнительность в биологии имеет не принципиальный, но практический характер, определяемый чрезвычайной сложностью живого тела. Практическая дополнительность преодолима.

Развитие молекулярной биологии привело к атомистическому истолкованию основных явлений жизни — таких как наследственность и изменчивость. В последние десятилетия успешно развивается и физическая теория целостных биологических систем, основанная на идеях синергетики (гл. 15).

В 1945 г. Шредингер написал книгу «Что такое жизнь с точки зрения физики», оказавшую существенное влияние на развитие биофизики и молекулярной биологии. В этой книге внимательно рассмотрено несколько важнейших проблем. Первая из них — термодинамические основы жизни. На первый взгляд имеется решительное противоречие между эволюцией изолированной физической системы к состоянию с максимальной энтропией, т. е. неупорядоченностью (второе начало термодинамики), и биологической эволюцией, идущей от простого к сложному. Шредингер говорил, что организм «питается отрицательной энтропией». Это означает, что организмы и биосфера в целом не изолированные, но открытые системы, обменивающиеся с окружающей средой и веществом, и энергией. Неравновесное состояние открытой системы поддерживается оттоком энтропии в окружающую среду. Вторая проблема — общие структурные особенности организмов. По словам Шредингера, организм есть *апериодический кристалл*, т. е. высокоупорядоченная система, подобная твердому телу, но лишенная периодичности в расположении клеток, молекул, атомов. Это утверждение справедливо для строения организмов, клеток и биологических макромолекул (белки, нуклеиновые кислоты). Как мы увидим, понятие об апериодическом кристалле важно для рассмотрения явлений жизни на основе теории информации. Третья проблема — соответствие биологических явлений законам квантовой механики. Обсуждая результаты радиобиологических исследований, проведенных Тимофеевым-Ресовским, Циммером и Дельбрюком, Шредингер отмечает квантовую природу радиационного мутагенеза. В то же время применения квантовой механики в биологии не тривиальны, так как организмы принципиально макроскопичны. Шредингер задает вопрос: «Почему атомы малы?» Очевидно, что этот вопрос лишен смысла, если не указано, по сравнению с чем малы атомы. Они малы по сравнению с нашими мерами длины — метром, сантиметром. Но эти меры определяются размерами человеческого тела. Следовательно, говорит Шредингер, вопрос следует переформулировать: почему атомы много меньше организмов, иными словами, почему организмы построены из большого числа атомов? Действительно, число атомов в наименьшей бактериальной клетке

Mycoplasma laidlawii имеет порядок 10^9. Ответ на вопрос заключается в том, что необходимая для жизни упорядоченность возможна лишь в макроскопической системе, в противном случае порядок разрушался бы флуктуациями. Наконец, Шредингер задавался вопросом об устойчивости вещества генов, построенного из легких атомов C, H, N, O, P, на протяжении множества поколений. Ответ на этот вопрос дала позднее молекулярная биология, установившая двуспиральное строение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК).

Мы не останавливаемся на работах некоторых физиков, в которых утверждалось несоответствие биологических явлений и законов физики (Эльзассер, Вигнер и др.). Ошибочность этих работ была выявлена в научной литературе.

Сегодня имеются все основания утверждать, что современная физика не встречается с границами своей применимости к рассмотрению биологических явлений. Трудно думать, что такие границы обнаружатся в будущем. Напротив, развитие биофизики как части современной физики свидетельствует о ее неограниченных возможностях. Приходится, конечно, вводить новые физические представления, но не новые принципы и законы.

§ 1.3. Живая и неживая природа

Определим живой организм как открытую, саморегулируемую, самовоспроизводящуюся и развивающуюся гетерогенную систему, важнейшими функциональными веществами которой являются биополимеры — белки и нуклеиновые кислоты. Организм — система историческая, в том смысле, что он является результатом филогенетического, эволюционного развития и сам проходит путь онтогенетического развития — от зиготы до старости и смерти.

Обычная физика неживой природы не имеет дела с историей. Электрон, атом, молекула характеризуются постоянными физическими свойствами, независимо от своего происхождения. Конечно, обычная физика изучает кинетические, динамические процессы. При этом, однако, не рассматривается индивидуальная история физического тела.

Сказанное не означает, что в физике неживой природы нет исторических проблем. Само возникновение живой природы, ее эволюционное развитие и индивидуальное развитие каждой особи есть часть развития Вселенной как целого, часть развития Солнечной системы, часть развития Земли. Следовательно, имеет смысл рассмотреть сходство и различие между биофизикой, с одной стороны, и космологией, астрофизикой и геофизикой, с другой. Такое рассмотрение поучительно, так как эти разные области физики могут обогатить друг друга едиными подходами к решению исторических задач.

Согласно современным представлениям, история Вселенной начинается с малого сгустка плазмы громадной плотности. При-

мерно $2 \cdot 10^{10}$ лет назад этот сгусток начал расширяться взрывным образом, причем из фотонов и нейтрино возникали электроны и нуклоны, затем, по мере охлаждения Вселенной, легкие, а далее тяжелые атомы. По-видимому, расширение Вселенной непрерывно. Силы всемирного тяготения определили возникновение звезд и галактик. При высоком гравитационном сжатии температура звезды повышается вплоть до возникновения термоядерных процессов. Эти процессы ответственны за эволюцию звезд, за такие катастрофические события, как вспышки сверхновых. Солнце — звезда, находящаяся на определенной стадии эволюции, образование планет является одним из следствий развития Солнца. По современным данным Земля существует около $4{,}5 \cdot 10^9$, жизнь на Земле около $3{,}5 \cdot 10^9$ лет.

В эволюции звезд и планетных систем так же, как и в биологической эволюции, происходит «борьба за существование» — возникшие центры тяготения конкурируют друг с другом за конденсируемый материал. И в космологии, и в биологии мы имеем дело с созданием новой информации при возникновении новых звезд или новых видов или особей. Новая информация создается в результате запоминания случайного выбора. Эти процессы протекают в результате неустойчивостей предшествующих состояний. Они имеют характер фазовых переходов (§ 15.5 и 17.6).

Таким образом, теоретические подходы, основанные на теории информации и рассмотрении устойчивости динамических систем, в принципе являются общими для физики живой и неживой природы.

§ 1.4. Биологическая индивидуальность

Принципиальная особенность живой природы состоит в ее неограниченном многообразии. В настоящее время известно около $3 \cdot 10^6$ видов различных живых существ. Число различных особей многоклеточных растений или беспозвоночных животных вообще не поддается оценке — оно чрезвычайно велико. Мы пока не различаем индивидуальности представителей данного штамма одноклеточных, но, надо думать, такие особенности существуют. Нет двух одинаковых организмов на Земле. Это объясняется генетической изменчивостью, реализуемой в очень широких пределах, и различиями во взаимодействиях со средой. Дарвиновская эволюция неразрывно связана с изменчивостью, с неограниченной индивидуализацией организмов. Научная биология не могла бы существовать без своих описательных разделов — зоологии и ботаники.

В неживой природе ситуация иная. Число различных атомов, считая изотопы, составляет около 5000. Сегодня известно около 10^2 элементарных частиц. Число различных атомов и простых молекул, наблюдаемых в космосе, также имеет порядок сотен, и при исследовании эволюции звезд не приходится оперировать бо́льшим числом элементарных сущностей. Число различных

соединений, известных современной химии, имеет порядок 10^6, но здесь нет никаких ограничений. Существенно, однако, что атомы или молекулы данного вещества неотличимы друг от друга.

Конечно, и в неживой природе имеется индивидуализация на макроскопическом уровне. Реальные кристаллы данного минерала различаются, так как они вырастали в различных условиях. Нет двух совершенно одинаковых камней, обкатанных морским прибоем.

Однако это многообразие не имеет принципиального значения для развития неживой природы, в которой при наличии изменчивости отсутствует наследственность.

Каковы могут быть химические, молекулярные основы безграничного разнообразия живых систем? Они определяются макромолекулярным строением генов и организмов. Полимерные цепи, макромолекулы не подчиняются основному закону химии — закону постоянства состава. Представим себе сополимер, построенный из двух сортов мономерных единиц. Если число звеньев макромолекулярной цепи равно 100 (это совсем не длинная цепь), то число различных цепей, содержащих два типа звеньев, равно $2^{100} \approx 10^{30}$. Таким образом, в данном макроскопическом образце сополимера может не быть двух одинаковых макромолекул.

Действительно, в конечном счете биологическая изменчивость определяется разнообразием генов, т. е. достаточно протяженных участков макромолекул ДНК, представляющих собой сополимеры, построенные из звеньев четырех типов.

Как и физика в целом, биофизика — количественная наука, широко применяющая математический аппарат. Биология как таковая, и прежде всего популяционная генетика, также математизируется. Однако имеются большие трудности при математическом описании индивидуальных особенностей организмов. Такое описание может быть лишь численным, но не аналитическим.

§ 1.5. Финализм и каузальность

Биологическая эволюция определяется преимущественным выживанием популяций, более приспособленных к условиям среды. Соответственно строение организма характеризуется такой приспособленностью и адаптацией к определенной экологической нише. Поэтому в биологии естественным образом возникает финалистическая трактовка изучаемых явлений. Развитие зиготы во взрослый организм можно описывать, пользуясь понятием цели: целью развития является создание приспособленного организма. Уже на ранних стадиях эмбриогенеза определенные группы клеток предназначены для развития в определенный орган, и этим задается их функциональность на всех уровнях, вплоть до молекулярного.

Организм подобен машине, построенной по плану для достижения определенных целей. Более того, это машина высшего

уровня сложности, способная целесообразно реагировать на заранее не запланированные события. Пример — производство организмом высшего животного антител в ответ на практически любые антигены, в том числе и искусственные, с которыми никогда не приходится встречаться в природе. Финалистическое описание непосредственно следует из историчности живых организмов. Оно не свойственно обычной физике и химии. Очевидна бессодержательность такого, например, утверждения: «Ионы натрия и хлора взаимодействуют друг с другом для того, чтобы построить кубический кристалл». Напротив, утверждение «...так как ионы Na^+ и Cl^- имеют единичные заряды и такие-то радиусы, ионный кристалл NaCl должен быть кубическим» имеет ясный смысл. Биологи часто задают вопрос «для чего?», физики спрашивают «почему?». Очевидно, что истинный научный смысл имеет именно второй вопрос. Физика и естествознание в целом каузальны — наука ищет причины (causa) явлений.

В действительности нет противоречия между финализмом и каузальностью, и указанное различие между физикой и биологией является внешним. Финализм возникает в физике всякий раз, когда мы встречаемся с проблемами устойчивости, с вариационными принципами. Мы имеем в виду устойчивость в строгом математическом смысле, по Ляпунову (см. гл. 15). Устойчивое состояние динамической системы сохраняется при малых возмущениях — система, будучи отклонена от этого состояния, в него возвращается. Финалистическая формулировка: система стремится сохранить свое состояние. Напротив, неустойчивое состояние необратимо изменяется при малом возмущении — система стремится перейти в другое состояние. Пример — состояния равновесия физического маятника, устойчивое и неустойчивое.

Вариационный принцип всегда финалистичен. Так, согласно принципу наименьшего действия Гамильтона, вариация действия равна нулю, действие минимально. «Цель механической системы состоит в ее наименьшем действии». Но, как показывает классическая механика, принцип Гамильтона эквивалентен уравнениям движения Лагранжа, в свою очередь следующих из второго закона Ньютона. Этот закон каузален, он описывает ускоренное движение как результат действия сил. Другие примеры финалистически формулируемых законов физики: принцип Ферма в оптике, принцип Ле Шателье в термодинамике, правило Ленца в электродинамике. Вариационный финализм сводится к каузальности. Число таких примеров неограниченно.

§ 1.6. Свойства открытых систем

Как уже сказано, живые системы принципиально открыты и тем самым неравновесны. Одним из первых это понял советский биолог Бауэр, писавший, что «...неравновесное состояние живой материи и, следовательно, ее постоянно сохраняющаяся работоспособность обусловливаются... молекулярной структурой живой

материи, а источником работы, производимой живыми системами, служит в конечном счете свободная энергия, свойственная этой молекулярной структуре, этому состоянию молекул». Дальнейшее развитие термодинамики открытых систем применительно к биологии связано с работами Берталанффи и, главным образом, Пригожина и его школы.

Организм есть термодинамически открытая система, в которой протекают химические реакции. Биохимические реакции на всех стадиях являются каталитическими, катализаторами служат белки — ферменты. Изменение энтропии такой системы выражается суммой энтропии, производимой внутри системы, d_iS, и энтропии, поступающей извне или уходящей во внешнюю среду, d_eS:

$$dS = d_iS + d_eS; \tag{1.1}$$

d_iS всегда положительна вследствие второго начала — если поместить организм в изолирующую оболочку, $d_eS = 0$, и энтропия может только возрастать; d_iS есть производство энтропии в результате внутренних химических реакций. Знак d_eS зависит от конкретной ситуации. Из уравнения (1.1) следует возможность стационарного, но неравновесного состояния открытой системы. В стационарном состоянии термодинамические величины, характеризующие систему, постоянны, но не имеют равновесных значений. Энтропия системы не максимальна. Имеем в *стационарном состоянии*

$$dS = 0, \quad \text{т. е.} \quad d_eS = -d_iS < 0. \tag{1.2}$$

Иными словами, производимая энтропия полностью уходит во внешнюю среду.

Рассмотрим изолированную систему, состоящую из организма и окружающей его среды. Организм получает из этой среды пищу, кислород, воду и в свою очередь выделяет в нее различные вещества. Между организмом и средой осуществляется теплообмен. В таких условиях практически находится космонавт в космическом корабле. Организм космонавта — открытая система по отношению к кораблю, который хорошо изолирован от окружающего космического пространства. Общее изменение энтропии всей системы, согласно второму началу, положительно:

$$dS = dS_1 + dS_2 > 0, \tag{1.3}$$

где dS_1 и dS_2 — изменения энтропии космонавта и окружающей среды. Имеем

$$dS_1 = d_iS_1 + d_eS_1. \tag{1.4}$$

Изменение энтропии dS_2 происходит лишь в результате обмена среды веществом и энергией с космонавтом,— продукции энтропии в среде, окружающей космонавта, практически нет. Следовательно,

$$dS_2 = -d_eS_1 \quad \text{и} \quad dS = d_iS_1 > 0. \tag{1.5}$$

Если состояние космонавта стационарно, то

$$dS_1 = 0, \quad d_e S_1 = -d_i S_1 < 0, \quad dS_2 = dS = d_i S_1 > 0. \qquad (1.6)$$

Таким образом, стационарное состояние космонавта поддерживается возрастанием энтропии в окружающей среде, определяемым оттоком в нее энтропии из организма космонавта, компенсирующим продукцию энтропии в организме. В этом и состоит смысл слов Шредингера: «организм питается отрицательной энтропией». Энтропия среды возрастает, $dS_2 > 0$, вследствие выделения теплоты космонавтом и вследствие того, что энтропия веществ, выделяемых космонавтом, выше энтропии потребляемых им веществ. Стационарное состояние космонавта будет сохраняться до тех пора, пока не истощатся питательные вещества в окружающей среде или пока необратимые процессы в организме космонавта не приведут к его изменению (старение). Стационарное состояние может быть длительным, но не вечным. Его реализация определяется наличием двух шкал времени — быстрой шкалой для времени обмена энтропией с окружающей средой и относительно медленной шкалой для времени исчерпания запасов питательных веществ и (или) старения организма.

Рассмотрим еще один пример. Имеем два больших тепловых резервуара, находящихся при температурах T_1 и T_2 и соединенных друг с другом тонким проводником теплоты. В проводнике устанавливается постоянный поток теплоты, любой отрезок проводника находится в стационарном состоянии. Оно сохранится, пока сколько-нибудь заметно не изменятся температуры T_1 и T_2, которые медленно выравниваются. Время установления стационарного состояния много меньше времени достижения окончательного равновесия, в котором $T_1 = T_2$. При расчете стационарного режима в быстрой временной шкале температуры T_1 и T_2 считаются постоянными — они изменяются в медленной шкале.

Само существование биосферы можно рассматривать как стационарный процесс, реализуемый на фоне грандиозного необратимого процесса охлаждения Солнца.

Стационарное состояние открытой системы может быть близким или далеким от равновесия, может быть устойчивым или неустойчивым. В свою очередь нестационарное состояние может быть близким или далеким от стационарного. Как мы увидим (гл. 9), термодинамические подходы к анализу открытых систем, близких или далеких от равновесия, различны. При этом вводятся строгие количественные критерии близости или удаленности. Целый ряд фактов свидетельствует о том, что биологические системы далеки от равновесия. Биологическое развитие возможно лишь в далекой от равновесия системе.

Из сказанного не следует, однако, невозможность применения обычной равновесной термодинамики к рассмотрению каких бы то ни было биологических явлений. Динамические, необратимые жизненные процессы происходят внутри организованной структуры, которая изменяется медленно или остается практически

неизменной. Это справедливо для всех уровней биологического строения, начиная с молекулярного. Соответственно, изучая структуру, мы можем исходить из условного термодинамического равновесия. Само возникновение биологической структуры можно грубо представить двумя стадиями — биосинтезом составляющих элементов (макромолекул, клеток) и сборкой из них организованной системы. Процесс сборки находится в значительной степени под термодинамическим контролем, скажем, на молекулярном уровне система стремится к состоянию с наименьшим химическим потенциалом. Равновесная термодинамика оказывается одной из основ молекулярной биофизики.

Самоорганизация и эволюция открытых биологических систем на всех уровнях, начиная с клетки и кончая биосферой в целом, происходят вследствие оттока энтропии в окружающую среду. Земля получает энергию от Солнца в виде потока фотонов. Согласно обоснованным оценкам (Эбелинг), поток энергии, достигающий Землю, равен

$$dE/dt = 1{,}2 \cdot 10^{17} \text{ Вт}. \qquad (1.7)$$

Такое же количество энергии экспортируется вновь, но при более низкой температуре. Общий экспорт энтропии равен

$$\frac{d_e S}{dt} = \frac{4}{3} \cdot 1{,}2 \cdot 10^{17} \text{ Вт} \cdot \left[\frac{1}{5800 \text{ К}} - \frac{1}{260 \text{ К}} \right] = -6 \cdot 10^{14} \text{ Вт/К}. \qquad (1.8)$$

Эта формула получена на основе статистической физики излучения черного тела; 5800 К — температура излучения Солнца, 260 К — средняя температура излучения Земли. Из (1.8) следует, что плотность оттока энтропии в среднем составляет

$$J_S = -1 \text{ Вт}/(\text{К} \cdot \text{м}^2). \qquad (1.9)$$

Эта величина, представляющая верхний предел экспорта энтропии Землей, ответственна за биологическое развитие и эволюцию.

В то же время очевидно, что в биологии мы встречаемся со сложным комплексом термодинамических и кинетических явлений. Различие термодинамики и кинетики иллюстрируется течением химической реакции. Реакция принципиально возможна, лишь если она сопровождается понижением свободной энергии, $\Delta G < 0$. Это необходимое, однако еще недостаточное условие для протекания реакции. Если начальное и конечное состояния системы разделены высоким активационным барьером, константа k скорости реакции, зависящая экспоненциально от высоты энергетического барьера E_a, согласно *закону Аррениуса*

$$k = A \exp(-E_a/RT), \qquad (1.10)$$

где A — предэкспоненциальный множитель, R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, может быть исчезающе малой. Поэтому можно рассматривать неравновесное состояние, защищенное высоким барьером, как равновесное. Пример — гремучий газ, смесь H_2 и O_2, взрывающаяся при активации цепной реак-

ции пламенем спички, но устойчивая, т. е. квазиравновесная, в отсутствие активации. Роль катализатора состоит в снижении активационного барьера E_a.

Неравновесная термодинамика оказывается необходимой при трактовке динамических процессов,— прежде всего, явлений развития.

С термодинамикой связана и теория информации. Увеличение количества информации в системе, рассматриваемой как сообщение, всегда сопряжено с понижением энтропии (см. гл. 9). Информационные аспекты биологии весьма поучительны. Выясняется, что понятие количества информации совершенно недостаточно для рассмотрения развивающихся биологических систем. Оказывается необходимым рассматривать и рецепцию информации, и создание новой информации. И то, и другое возможно лишь в условиях неравновесия, нестационарности и неустойчивости. В биологии важно не количество информации, но ее качество, смысл или ценность (§ 17.8).

§ 1.7. Разделы и методы биофизики

Живая природа, живые организмы представляют собой многоуровневые сложные системы. Большие и малые молекулы, клеточные органоиды, клетки, ткани, органы, организмы, популяции, биоценозы, биосфера — уровни, которыми должны заниматься и биология, и биофизика.

Биофизика условно подразделяется на три области: молекулярная биофизика, биофизика клетки, биофизика сложных систем. Это деление не обязательно, но удобно. Охарактеризуем содержание и методы трех областей биофизики.

Молекулярная биофизика изучает строение и физико-химические свойства биологически функциональных молекул, прежде всего биополимеров — белков и нуклеиновых кислот. Задачи молекулярной биофизики состоят в раскрытии физических механизмов, ответственных за биологическую функциональность молекул, например за каталитическую активность белков-ферментов. Молекулярная биофизика — наиболее развитая область биофизики. Она неотделима от молекулярной биологии и химии. Крупные успехи в этой области понятны — легче изучать молекулы (даже наиболее сложные из известных науке молекулы белков), чем клетки или организмы. Молекулярная биофизика опирается, с одной стороны, на биолого-химические дисциплины (биохимия, молекулярная биология, биоорганическая и бионеорганическая химия), с другой, на физику малых и больших молекул. Соответственно этому в гл. 2 мы рассматриваем химические основы биофизики, в гл. 3 — физику макромолекул и лишь после этого обращаемся к молекулярной биофизике как таковой (гл. 4—8).

Поскольку главные задачи молекулярной биофизики относятся к структуре молекул и их функциональности, как уже сказа-

но, мы можем рассматривать равновесные свойства молекул. Теоретический аппарат молекулярной биофизики — равновесная термодинамика, статистическая механика и, конечно, квантовая механика, поскольку речь идет о химии, о молекулах. Для экспериментального исследования биологически функциональных молекул (будем далее называть их просто биологическими молекулами) применяется широкий арсенал физических методов. Это, во-первых, методы, употребляемые в физике макромолекул для определения их молекулярных масс, размеров и формы — седиментация в ультрацентрифуге, рассеяние света и рассеяние рентгеновских лучей растворами исследуемых веществ и т. д. Во-вторых, методы исследования структуры молекул, основанные на взаимодействии вещества со светом, начиная с рентгеновских лучей и кончая радиочастотным излучением. Методы оптики и спектроскопии, в широком смысле этих слов, включают рентгеноструктурный анализ, γ-резонансную спектроскопию (эффект Мёссбауэра), электронные и колебательные спектры, т. е. спектры поглощения и люминесценции в ультрафиолетовой и видимой областях, инфракрасные спектры и спектры комбинационного рассеяния. Сюда же относится спектрополяриметрия, т. е. исследования естественного и магнитного вращения плоскости поляризации света и кругового дихроизма. Очень ценную информацию дают спектры ядерного и электронного парамагнитного резонансов (ЯМР и ЭПР). В случае ЭПР особенно важно применение парамагнитных спиновых меток. В-третьих, методы калориметрии, применяемые для изучения превращений биологических макромолекул. И, наконец, прямое изучение структуры белков и нуклеиновых кислот (а также, конечно, надмолекулярных структур, клеточных органоидов и клеток) посредством электронной микроскопии.

Применение ряда этих методов в биологии специфично. Поэтому необходимо рассказать о них в курсе биофизики. Глава 5 посвящена краткому изложению теории методов оптики и спектроскопии и полученных с их помощью биофизических результатов.

Молекулярная биофизика естественно переходит в биофизику клетки, изучающую строение и функциональность клеточных и тканевых систем. Эта область биофизики является самой старой и традиционной. Ее главные задачи связаны сегодня с изучением физики биологических мембран и биоэнергетических процессов. Биофизика клетки включает изучение генерации и распространения нервного импульса, изучение механохимических процессов (в частности, мышечного сокращения), изучение фотобиологических явлений (фотосинтез, рецепция света, зрение, биолюминесценция). В этой области также применяются уже перечисленные экспериментальные методы. Биофизика клетки имеет дело с более сложными задачами и встречается с бо́льшими трудностями по сравнению с молекулярной биофизикой. Биофизике клетки посвящены гл. 10—14.

Биофизикой сложных систем условно называется преимущественно теоретическая область биофизики, посвященная рассмотрению общих физико-биологических проблем и физико-математическому моделированию биологических процессов. Перечислим основные современные разделы теоретической биофизики сложных систем.

1. Общая теория диссипативных нелинейных динамических систем — термодинамика необратимых процессов и кинетическое моделирование.

2. Теория возбудимых сред, частью которой является теория биологических колебательных процессов.

3. Общетеоретическая трактовка биоэнергетических явлений.

4. Общая теория и моделирование процессов биологического развития — эволюции, онтогенеза, канцерогенеза, иммунитета.

Этим разделам биофизики специально посвящены гл. 9, 15—17, но с теми же общими идеями мы встретимся и в остальных главах. В конечном счете любой вопрос, обращенный к живой природе, имеет эволюционный характер.

Все разделы биофизики находят сегодня важные практические приложения, прежде всего в медицине и фармакологии, а также в сельском хозяйстве.

Глава 2

ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОФИЗИКИ

§ 2.1. Химия и биология

Живая клетка, живой организм представляют собой сложные химические машины. Они существуют благодаря химическим превращениям веществ, поступающих извне, и выделению веществ в окружающую среду, благодаря метаболизму. Биология и биофизика неразрывно связаны с химией.

Никакие физические методы сами по себе не были бы в состоянии установить структуру сложных молекул без химических исследований. Химия решает эти задачи, изучая строение веществ и их превращения в химических реакциях.

Химия жизни, органическая химия, поначалу была совершенно отделена от неорганической. Она считалась надежной опорой витализма, до той поры, когда научились синтезировать органические соединения из веществ неживого происхождения (начало было положено синтезом мочевины $CO(NH_2)_2$, проведенным Вёлером в 1828 г.). В дальнейшем органическая химия перестала быть химией живого и превратилась в синтетическую химию соединений углерода — химию углеводородов и их производных. Почти независимо развивалась биохимия — наука о строении и свойствах биологических молекул, о течении химических реакций в живых организмах. Биохимия достигла грандиозных успехов в расшифровке сложных сетей метаболизма. Из биохимии в союзе с физикой выросла *молекулярная биология*, занимающаяся физико-химическим, молекулярным истолкованием основных биологических явлений, прежде всего наследственности. Одновременно органическая химия вновь обратилась к живой природе на основе многолетнего опыта исследований органических соединений. Возникла *биоорганическая химия*, а затем и *бионеорганическая химия*, изучающая биологические молекулы, содержащие атомы металлов. Провести границы между перечисленными областями исследований химии жизни невозможно, да в этом и нет необходимости.

Отметим основные особенности химии жизни — химии биологических молекул.

1. Живая система обязательно химически гетерогенна. Бессмысленно говорить о живых молекулах — отдельно взятые биологические молекулы не живут.

2. Живая природа характеризуется единством химического строения. Грандиозное многообразие биологических видов и особей не означает чрезвычайного разнообразия биологических молекул и биохимических реакций. Основные вещества и основные химические механизмы едины во всей живой природе. Все белки строятся из двадцати аминокислот, все нуклеиновые кислоты — из четырех нуклеотидов. Одни и те же атомные структуры фигурируют во всех организмах. Однотипны и фундаментальные биохимические процессы. Разнообразие организмов определяется разнообразием сочетаний одних и тех же атомных групп и их взаимодействий.

3. Строение и свойства клетки и организма в конечном счете диктуются нуклеиновыми кислотами (ДНК и РНК), обладающими «законодательной» властью в том смысле, что ими задается генетическая программа синтеза белков. В свою очередь белки обладают «исполнительной» властью уже потому, что ни одна химическая реакция в клетке не идет без участия специального фермента.

4. Биохимические процессы и биологические молекулы являются результатом эволюционного развития. Биологической эволюции предшествовала химическая (гл. 17), далее они были связаны неразрывно. Виды и организмы характеризуются биохимической, молекулярной адаптацией к условиям среды. Изучая химию жизни, необходимо постоянно иметь в виду биологическое развитие.

5. Жизнь характеризуется точной и тонкой индивидуализацией. Малые различия в строении молекул, например различия между метильной и этильной группами, не имеющие существенного значения в обычной химии, очень важны в биологии (этиловый спирт $H_3C—CH_2—OH$ вызывает опьянение, метиловый спирт $H_3C—OH$ — слепоту). Биологические молекулы и макромолекулы имеют строго определенные состав и строение.

6. Химические реакции в организмах строго регулируются как прямыми и обратными связями в многостадийных процессах метаболизма, так и пространственным разделением реакций вследствие *компартментации*, реализуемой клеточными и внутриклеточными мембранами. Поддерживаются тонкие концентрационные градиенты.

7. Наконец, укажем, что биологические молекулы построены из атомов легких элементов: C, H, O, N, P, S. Кроме того, в организмах универсальна функциональность ионов щелочных и щелочноземельных металлов Na, K, Ca, Mg. Важнейшую роль играют малые количества других металлов — Fe, Zn и т. д., вплоть до Mo.

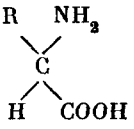
Человеческий организм содержит (в атомных процентах) 60,56 H, 25,67 O, 10,68 C, 2,44 N, 0,23 Ca, 0,13 P, 0,13 S, 0,08 Na, 0,04 K, 0,03 Cl, 0,01 Mg и много меньшие количества Fe, Zn, Cu, Co, Se, F, I. Избыток H и O определяется большим содержанием воды.

Далее в этой главе дается краткая характеристика наиболее важных биологических молекул и биохимических процессов. Наша задача состоит не в дублировании курсов биохимии, но в суммировании основных сведений, необходимых для изложения биофизики.

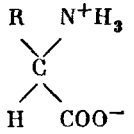
§ 2.2. Аминокислоты

Все белки построены из 20 типов аминокислотных остатков; ряд аминокислот, не фигурирующих в белках, участвует в метаболизме. По-видимому, аминокислоты возникали на Земле на первом этапе химической эволюции около $4 \cdot 10^9$ лет назад, в результате химических реакций в архаической восстановительной атмосфере и в океане при поглощении энергии (гл. 17). Простейшие аминокислоты встречаются и в метеоритах.

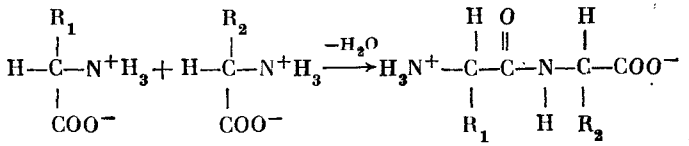
В белках фигурируют остатки *α-аминокислот*, имеющих строение



где R — радикал, углеводородный или содержащий помимо C и H и другие атомы — O, S, N. Как показывает изучение электрических свойств аминокислот (§ 2.3), их строение точнее выражается формулой *диполярного иона*



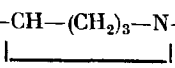
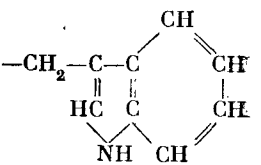
Образование белковой или полипептидной цепи происходит путем поликонденсации аминокислот:



причем образуются пептидные связи —NH—CO—.

В табл. 2.1 дана сводка 20 канонических аминокислотных остатков —CO—CHR—NH—, которые классифицированы по электрохимическим свойствам. Среди них есть алифатические углеводородные остатки (Ала, Вал, Гли, Иле, Лей), остатки, содержащие гидроксил (Сер, Тре), амидную группу (Асн, Глн), карбоксильную группу (Асп, Глу), содержащие серу (Цис, Мет), содержащие ароматические π-электронные циклы (Тир, Фен,

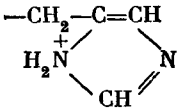
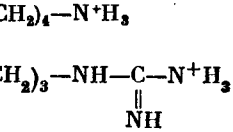
Таблица 2.1. Каноннческие аминокислотные остатки

№	Наименование остатка и аминокислоты	Обозначение	Краткое обозначение	Радикал—R
		1. Нейтральные остатки		
1	Глицил Глицин	Гли (Gly)	G	—H
2	Аланил Аланин	Ала (Ala)	A	$-CH_3$
3	Валил Валин	Вал (Val)	V	$-CH(CH_3)_2$
4	Лейцил Лейцин	Лей (Leu)	L	$-CH_2-CH(CH_3)_2$
5	Изолейцил Изолейцин	Иле (Ile)	I	$-CH(C_2H_5)CH_3$
6	Фенилаланил Фенилаланин	Фен (Phe)	F	$-CH_2-C_6H_5$
7	Пролил Пролин *)	Про (Pro)	P	
8	Триптофанил Триптофан	Трп (Trp)	W	
9	Серил Серин	Сер (Ser)	S	$-CH_2OH$
10	Треонил Треонин	Тре (Thr)	T	$-CH(OH)CH_3$
11	Метионил Метионин	Мет (Met)	M	$-CH_2-CH_2-S-CH_3$
12	Аспарагинил Аспарагин	Асн (Asn)	N	$-CH_2-CO-NH_2$
13	Глутаминил Глутамин	Глн (Gln)	Q	$-CH_2-CH_2-CO-NH_2$
14	Цистеинил **) Цистеин	Цис—SH(Cys—SH)	C	$-CH_2SH$
		2. Кислотные остатки (в виде анионов)		
15	Аспартил Аспарагиновая кислота	Асп (Asp)	D	$-CH_2-COO^-$
16	Глутамил Глутаминовая кислота	Глу (Glu)	E	$-CH_2-CH_2-COO^-$
17	Тирозил Тирозин	Тир (Tyr)	Y	$-CH_2-C_6H_4-O^-$

*) Пролин — не амино-, а иминокислота, содержащая вместо аминогруппы NH_2 иминогруппу NH.

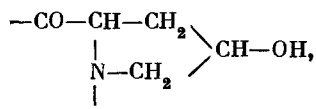
**) Как правило, остатки цистеина в белке соединены дисульфидной связью с потерей водорода $-CH_2-S-S-CH_2-$. При этом остаток называется цистинилом и обозначается Цис (Cys), краткое обозначение также C.

Продолжение табл. 2.1

№	Наименование остатка и аминокислоты	Обозначение	Краткое обозначение	Радикал—R
	3. Основные остатки (в виде катионов)			
18	Гистидил Гистидин	Гис (His)	H	
19	Лизил Лизин	Лиз (Lys)	K	$-(CH_2)_4-N^+H_3$
20	Аргинил Аргинин	Арг (Arg)	R	

Трп, Гис). Этим обеспечивается все многообразие свойств и строения белков.

Помимо 20 канонических остатков, в белках встречаются производные некоторых радикалов. Среди этих минорных остатков важен оксипролил



так как он содержится в значительном количестве в одном из универсальных белков животных — в коллагене.

§ 2.3. Электролиты

Организмы содержат множество ионов — малые органические и неорганические катионы и анионы, основные и кислотные группы аминокислотных остатков в белках и нуклеотидов в нуклеиновых кислотах. Диссоциация электролитов на ионы определяется их водным окружением. Теория электролитов излагается в курсах физической химии; здесь мы ограничимся краткими сведениями, необходимыми для дальнейшего.

Согласно Бренстеду кислота есть молекула, от которой отщепляется протон, основание — молекула, присоединяющая протон. Вода является кислотой в реакции $H_2O \rightleftarrows H^+ + OH^-$ и основанием в реакции $H_2O + H^+ \rightleftarrows H_3O^+$ (ион оксония).

Вода — очень слабый электролит, ее константа диссоциации мала. При 25°C в воде

$$[H^+][OH^-] = K[H_2O] = 10^{-14} \text{ моль}^2/\text{л}^2. \qquad (2.1)$$

Так как $[H^+] = [OH^-]$, концентрация водородных ионов в воде составляет 10^{-7} моль/л. Удобно пользоваться отрицательным десятичным логарифмом этой величины, обозначаемым pH. Для

воды, т. е. для нейтральной среды, pH = 7. Соответственно для кислот pH < 7, а для оснований pH > 7.

Биологические электролиты обычно слабые, т. е. они мало диссоциированы. Рассмотрим диссоциацию некоторой кислоты $HA \rightleftarrows H^+ + A^-$. Константа диссоциации, т. е. константа равновесия K, этой реакции равна

$$K = a_H a_A / a_{HA}, \tag{2.2}$$

где $a_H = a_A$ и a_{HA} — активности соответствующих веществ в растворе.

Активность — эффективная концентрация в реальном растворе, в котором молекулы взаимодействуют. Активность пропорциональна молярной концентрации:

$$a = \gamma c;$$

γ — коэффициент активности. В растворах, близких к идеальным, $\gamma \approx 1$, $a \approx c$. Поэтому

$$[H^+]^2 = K[HA], \tag{2.3}$$

и, обозначив $pK = -\lg K$, имеем

$$pH = {}^1/_2(pK - \lg [HA]). \tag{2.4}$$

Степень ионизации слабой кислоты в воде есть

$$\alpha = \frac{[A^-]}{[A^-] + [HA]} \approx \frac{[H^+]}{[HA]} = \sqrt{\frac{K}{[HA]}}. \tag{2.5}$$

Степень диссоциации или сила кислоты растет с K, т. е. убывает с ростом pK, сила основания убывает с ростом K, т. е. растет с pK. Условие $[A^-] = [H^+]$ справедливо лишь для нейтрального раствора. Вообще говоря,

$$pH = pK \pm \lg \frac{a_A}{a_{HA}} \tag{2.6}$$

или (в идеальном растворе)

$$pH = pK \pm \lg \frac{\alpha}{1-\alpha}. \tag{2.7}$$

Знак плюс отвечает кислоте, знак минус — основанию, для которого

$$\alpha = \frac{[HA]}{[A^-] + [HA]}, \tag{2.8}$$

что соответствует обратной реакции $A^- + H^+ \rightleftarrows HA$, где A^- — основание.

В неидеальном растворе активности отличны от концентраций. Имеем

$$pH = pK + \lg \frac{\gamma_A}{\gamma_{HA}} \pm \lg \frac{\alpha}{1-\alpha}. \tag{2.9}$$

Неидеальность раствора электролита определяется взаимодействием ионов друг с другом и с молекулами растворителя. При достаточно высокой концентрации ионов каждый из них окружен *ионной атмосферой* — ионами противоположного знака.

Теория Дебая — Хюккеля, исходящая из классической статистической механики и электростатики, позволяет определить свободную энергию взаимодействия ионов в растворе. Рассматривается система, состоящая из центрального иона и окружающей его атмосферы противоионов. Свободная энергия взаимодействия, приходящаяся на единицу объема раствора,

$$G = -\varkappa^3 \kappa T/12\pi, \tag{2.10}$$

где κ — постоянная Больцмана, T — температура, а $\varkappa$ — параметр Дебая — Хюккеля, называемый радиусом ионной атмосферы, но имеющий размерность, обратную длине. Параметр $\varkappa$ выражается через заряды ионов e_i и их число в единице объема n_i:

$$\varkappa^2 = \frac{4\pi}{\varepsilon \kappa T} \sum_i e_i^2 n_i, \tag{2.11}$$

где ε — диэлектрическая проницаемость растворителя; суммирование производится по всем сортам ионов i. Коэффициент активности γ_i данного сорта ионов находится из изменения свободной энергии при удалении иона из раствора

$$\frac{\partial G}{\partial n_i} = -\frac{e_i^2 \varkappa}{2\varepsilon} = -\frac{|e|^2 z_i^2 \varkappa}{2\varepsilon} = \kappa T \ln \gamma_i, \tag{2.12}$$

где $|e|$ — абсолютное значение заряда электрона, z_i — валентность иона. Имеем

$$\ln \gamma_i = -\frac{1}{2} \frac{e^2 z_i^2 \varkappa}{\varepsilon \kappa T} = -\frac{|e|^3 z_i^2 (2\pi)^{1/2}}{(\varepsilon \kappa T)^{3/2}} I^{1/2}. \tag{2.13}$$

Здесь I — так называемая *ионная сила* раствора

$$I = {}^1/_2 \sum_i n_i z_i^2. \tag{2.14}$$

Размерность I обратна размерности объема. Ионная сила характеризует общее число ионных зарядов в единице объема, независимо от их знаков. Ионная сила и величины pH и pK — важнейшие характеристики ионного раствора.

Таким образом, коэффициент активности ионов данного сорта зависит от концентрации ионов всех сортов.

Теория Дебая — Хюккеля справедлива для сильных электролитов. Аминокислоты — слабые электролиты. Однако при больших ионных силах коэффициенты активности аминокислот отличны от единицы. При малых ионных силах $\gamma_A \approx \gamma_{HA} \approx 1$ и (ср. (2.9))

$$\mathrm{pH} \approx \mathrm{pK} \pm \lg \frac{\alpha}{1-\alpha}. \tag{2.15}$$

При титровании слабой кислоты сильным основанием, скажем, NaOH, идет реакция

$$HA + Na^+ + OH^- \rightarrow A^- + Na^+ + H_2O.$$

Следовательно, $[A^-] \approx [Na^+]$. Степень ионизации α равна отношению концентраций сильного и слабого электролитов:

$$\alpha = \frac{[A^-]}{[A^-] + [HA]} \approx \frac{[Na^+]}{[HA]}. \qquad (2.16)$$

Определение α, pH и, следовательно, pK производится путем титрования кислоты щелочью или основания кислотой. Для грубых определений применяются химические индикаторы, для точных — потенциометрические методы, основанные на регистрации потенциала на электроде, опущенном в раствор. Потенциал меняется при титровании. Для определения pH пользуются стеклянным электродом. Этот электрод и электрод сравнения (обычно каломельный) помещаются в раствор с известной концентрацией исследуемого вещества. Разность потенциалов при надлежащей градуировке измеряется непосредственно в единицах pH.

Таблица 2.2. Электрохимические константы аминокислот

Аминокислота	pK_1	pK_2	pK_3	pH_i
Глицин	2,35	9,78		6,1
Аланин	2,34	9,87		6,1
Валин	2,32	9,62		6,0
Лейцин	2,36	9,60		6,0
Серин	2,21	9,15		5,7
Пролин	1,99	10,60		6,3
Триптофан	2,38	9,39		5,9
Аспарагиновая кислота	2,09	3,87(COO^-)	9,82(NH_3^+)	3,0
Глутаминовая кислота	2,19	4,28(COO^-)	9,66(NH_3^+)	3,2
Тирозин	2,20	9,11(NH_3^+)	10,1(O^-)	5,7
Цистеин	1,96	8,18(NH_3^+)	10,28(S^-)	5,1
Аргинин	2,02	9,04(NH_3^+)	12,48(гуанидин)	10,8
Лизин	2,18	8,95(NH_3^+)	10,53(NH_3^+)	9,7
Гистидин	1,77	6,10(имидазол)	9,18(NH_3^+)	7,6

Аминокислоты — амфотерные электролиты, характеризуемые двумя значениями pK, отвечающими титрованию кислотных групп COO^- щелочью (pK_1) и титрованию основных групп N^+H_3 кислотой (pK_2). В табл. 2.2 приведены некоторые значения pK_1, pK_2, pK_3 (для аминокислот с ионогенными радикалами), а также pH_i, отвечающие *изоэлектрической точке*. Если аминокислота заряжена положительно, она движется к катоду, если отрицательно — к аноду. В изоэлектрической точке молекула амфотерного электролита нейтральна и не участвует в электро-

проводности. Имеем для нейтральных аминокислот

$$pH_i = {}^1/_2(pK_1 + pK_2). \qquad (2.17)$$

Изучение электрохимических свойств аминокислот доказывает их диполярное строение (с. 25). Теплоты реакций ионизации органических кислот

$$RCOOH \rightleftarrows RCOO^- + H^+$$

малы, они имеют порядок величины 4 кДж/моль. Для реакций диссоциации замещенных ионов аммония

$$RN^+H_3 \rightleftarrows RNH_2 + H^+$$

теплоты велики — порядка 50 кДж/моль. Аминокислоты в кислом растворе характеризуются теплотами ионизации от 5,5 до 8,8 кДж/моль, в щелочном — от 42 до 55 кДж/моль. Следовательно, идут реакции

$$H_3N^+ - CHR - COO^- + H^+ \rightleftarrows H_3N^+ - CHR - COOH,$$

$$H_3N^+ - CHR - COO^- + OH^- \rightleftarrows H_2N - CHR - COO^- + H_2O.$$

Другими доказательствами диполярного строения аминокислот являются сильное повышение ε при их растворении в воде, большие плотности и высокие температуры плавления твердых аминокислот, что определяется сильным электростатическим взаимодействием.

При работе с биологическими веществами следует поддерживать постоянные значения pH. Стабилизация pH достигается с помощью *буферных растворов*. В присутствии нейтральных солей диссоциация слабых кислот и оснований не зависит от разбавления. Рассмотрим раствор слабой кислоты HA и ее натриевой соли NaA. Константа равновесия реакции

$$HA \rightleftarrows H^+ + A^-$$

равна

$$K = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}, \qquad (2.18)$$

и, так как $[A^-] = [H^+]$,

$$[H^+] = \sqrt{K[HA]}. \qquad (2.19)$$

В присутствии соли NaA, диссоциированной гораздо сильнее кислоты, $[A^-] \approx [NaA]$. Следовательно,

$$K = \frac{[H^+][NaA]}{[HA]} \qquad (2.20)$$

и

$$[H^+] = K\frac{[HA]}{[NaA]}; \qquad (2.21)$$

$[H^+]$ и, значит, pH зависят от отношения концентраций кислоты и соли, но не от степени разведения. Так, в растворе 0,1 N ук-

сусной кислоты и 0,1 N уксуснокислого натрия в воде pH = 4,628. При десятикратном разведении раствора pH = 4,670, при стократном pH = 4,73. При добавлении к 1 л воды 1 см³ 0,01 N HCl pH уменьшается с 7 до 5. При добавлении того же количества HCl к указанному раствору pH убывает с 4,628 до 4,540. Наряду с ацетатными, применяются фосфатные и другие буферы.

§ 2.4. Состав и первичная структура белков

Макромолекулы белков состоят из одной или нескольких полипептидных цепей, построенных из аминокислотных остатков. На одном, N-конце цепи находится NH_2-группа, на другом, C-конце — группа COOH. Характерные молекулярные массы (м. м.) отдельных полипептидных цепей в белках порядка 20 000, что соответствует 150—180 остаткам (средняя м. м. аминокислотного остатка равна 120). Молекулы, содержащие менее 100 остатков, принято называть не белками, а полипептидами. Таковы некоторые гормоны.

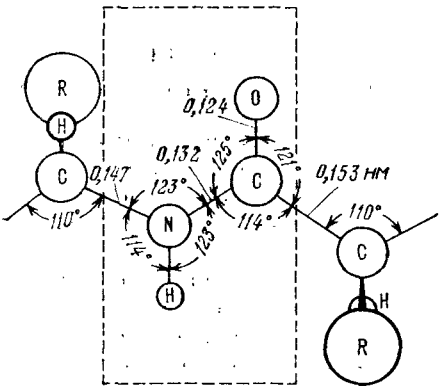
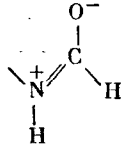


Рис. 2.1. Пептидная связь

Пептидная связь —CO—NH—, соединяющая аминокислотные остатки в белках, имеет специфическое плоское строение, как это было установлено методом рентгеноструктурного анализа (Полинг и Кори). Все четыре атома связи лежат в одной плоскости (рис. 2.1). Связь N—C укорочена по сравнению с таковой в алифатических аминах R—NH_2, где ее длина равна 0,147 нм. Это укорочение, равно как и плоское расположение связей, свидетельствует о сопряжении связей N—C и C=O, о перекрывании их электронных оболочек, сопровождаемом сдвигом электронной плотности от N к C. Это можно изобразить вкладом структуры



т. е. связь N—C частично двойная, связь C=O частично единичная.

Аминокислотный состав белка устанавливается в настоящее время автоматическими приборами. Белок расщепляется на аминокислоты в результате *гидролиза* — реакции, обратной поликон-

денсации:

$$-CHR_1-NH-CO-CHR_2- + H_2O \rightarrow -CHR_1-NH_2 + \\ + HOOC-CHR_2-$$

Гидролиз происходит при действии на белок щелочей, кислот, а также протеолитических ферментов (*протеаз*), катализирующих разрыв пептидных связей. Получаемый гидролизат — раствор смеси аминокислот — анализируется методами *хроматографии* и *электрофореза*. Укажем, что протеолитический гидролиз происходит при пищеварении — белки пищи расщепляются в пищеварительном тракте на аминокислоты, из которых строятся заново белки, необходимые организму.

Состав белков неравномерен — различные аминокислотные остатки представлены в белках с разными частотами. Имеются редкие и частые остатки, подобно тому как в русском тексте имеются редкие (например, ф) и частые (например, а) буквы. К наиболее редким остаткам относятся Трп, Мет, Цис, к наиболее частым — Ала, Сер, Гли. Это справедливо в среднем — некоторые специализированные белки имеют специфический состав, отличный от среднего (например, коллаген, см. § 4.9).

Последовательность аминокислотных остатков в белковой цепи называется ее первичной структурой. Определение первичной структуры производится путем частичного гидролиза белка с помощью протеаз, катализирующих расщепление пептидной связи лишь между определенными остатками. Так, трипсин «режет» лишь связи, образованные СО-группами остатков основных аминокислот — Арг или Лиз. В результате образуется смесь пептидов — коротких фрагментов белковой цепи. Их идентификация производится посредством химических и физико-химических методов (хроматография, электрофорез). Воздействуя вторым ферментом, можно «разрезать» другие связи в белке и получить смесь других фрагментов (пептидов) и т. д.

Широко применяемый для изучения биополимеров метод *гель-электрофореза* основан на различной подвижности макромолекул и их фрагментов в электрическом поле. Для разделения и исследования белков гель-электрофорез производится с додецилсульфатом натрия (ДСН), который связывается с молекулой белка, вызывая ее денатурацию. Подвижность молекулы в геле, на который наложено электрическое поле, зависит не только от заряда, но и от размеров молекулы (диффузионный эффект).

Зная строение пептидов, полученных при гидролизе различными ферментами, можно установить первичную структуру белка, решая задачи типа кроссвордов. В настоящее время установлены первичные структуры тысяч белков. Их сводки систематически публикуются в атласе белковых структур. На рис. 2.2 и 2.3 изображены первичные структуры рибонуклеазы быка и миоглобина кашалота. В первом случае имеются четыре дисульфидные связи, соединяющие друг с другом остатки Цис.

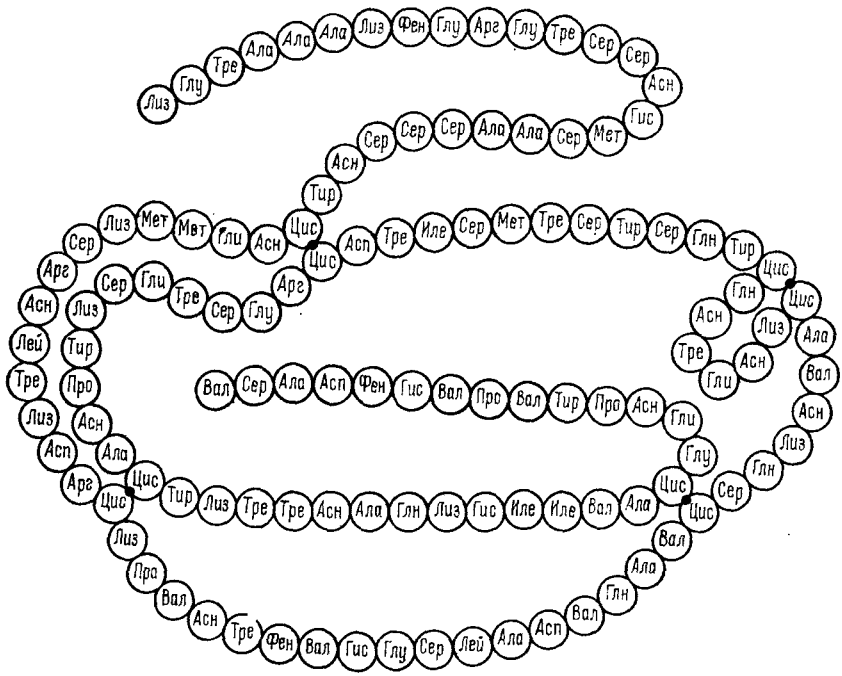


Рис. 2.2. Первичная структура рибонуклеазы быка

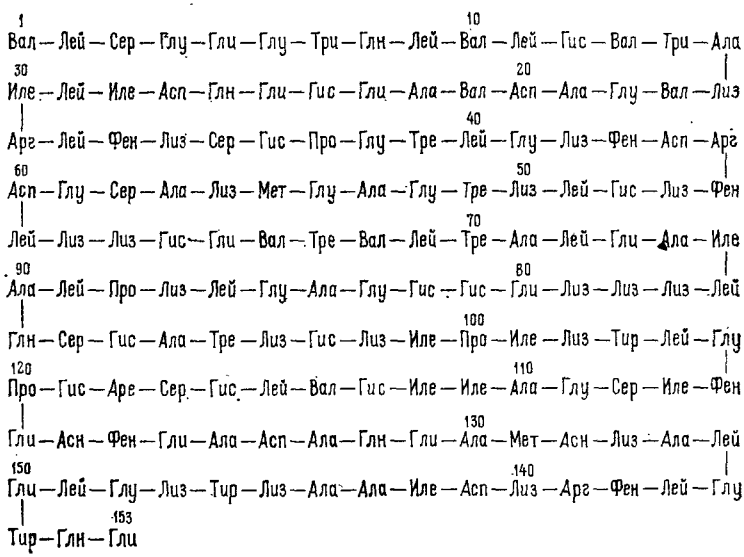


Рис. 2.3. Первичная структура миоглобина кашалота

Первичная структура белка — своего рода текст, написанный двадцатибуквенным алфавитом. Смысл, содержание этого текста, состоит в биологическом функционировании белка, которое, в конечном счете, определяется первичной структурой. В белковых текстах запечатлена биологическая эволюция — сопоставление гомологичных белков, выполняющих одну и ту же функцию в разных видах, позволяет выявить различия в текстах. Эти различия,

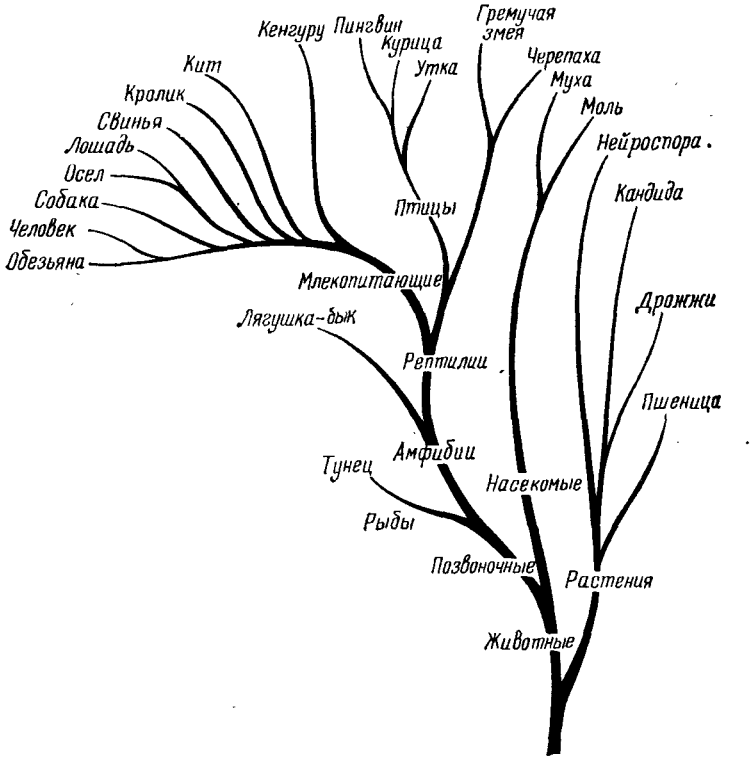


Рис. 2.4. Эволюционное древо, построенное на основе аминокислотного состава цитохрома *с*

определяемые мутационными замещениями аминокислотных остатков, тем больше, чем дальше отстоят друг от друга биологические виды. Особенно подробно изучен в этом отношении цитохром *с* — универсальный для всех организмов белок дыхательной цепи. Сопоставление первичных структур цитохромов *с* различных видов позволяет построить эволюционное древо. Оно показано на рис. 2.4. Изучены также гемоглобины и другие белки разных видов.

Первичная структура белка данного вида может изменяться также в результате мутаций. Возникают «опечатки» в белковом тексте, зачастую отрицательно сказывающиеся на функции бел-

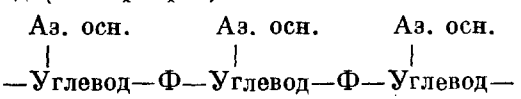
ка. Ряд наследственных заболеваний крови связан с мутациями гемоглобина. Тяжелое заболевание — серповидноклеточная анемия — вызывается замещением остатка Глу на Вал в шестом месте β-цепей гемоглобина. Гемоглобин человека состоит из четырех цепей — двух цепей α, содержащих по 141 остатку, и двух цепей β, содержащих по 146 остатков. Таким образом, замена всего лишь двух остатков из 574 приводит к весьма серьезным последствиям. В этом случае неполярные нейтральные остатки заменяются кислотными. Сейчас известно несколько сот мутантных гемоглобинов человека.

Далеко не все замены аминокислотных остатков приводят к заметным изменениям строения и биологических свойств белков. Большая часть замен нейтральна и не подвержена давлению естественного отбора (см. § 17.7).

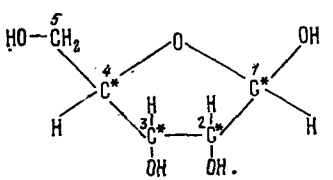
§ 2.5. Нуклеиновые кислоты

Второй важнейший вид биополимеров — нуклеиновые кислоты — макромолекулы, ответственные за биосинтез белков, за сборку их первичных структур.

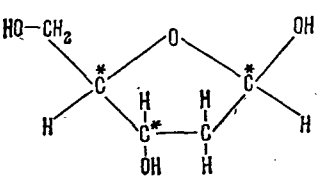
Основная цепь нуклеиновой кислоты состоит из чередующихся звеньев фосфорной кислоты и сахара — углевода рибозы в рибонуклеиновой кислоте (РНК) и дезоксирибозы в дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК). К каждому углеводному звену присоединено одно из четырех азотистых оснований. ДНК и РНК — тексты, написанные четырехбуквенным алфавитом. Общая схема цепи имеет вид (Ф — фосфат)



Структурные формулы рибозы и дезоксирибозы:



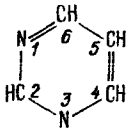
D-рибоза



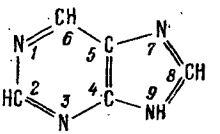
D-2-дезоксирибоза

Они различаются лишь заменой ОН-группы на Н у второго атома С. Звездочками обозначены асимметричные атомы С (см. § 2.7).

Азотистые основания являются производными пиримидина и пурина, азотсодержащих гетероциклических соединений:

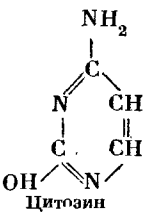


Пиримидин

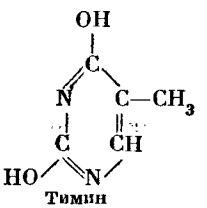


Пурин

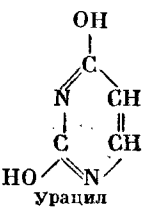
В нуклеиновых кислотах фигурируют пиримидины, цитозин (Ц) и тимин (Т) в ДНК и Ц и урацил (У) в РНК, и пурины, аденин (А) и гуанин (Г) в ДНК и РНК:



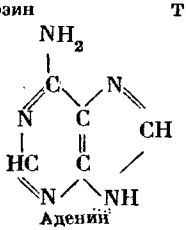
Цитозин



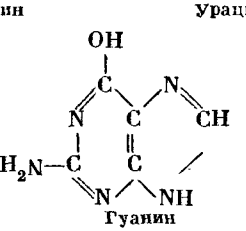
Тимин



Урацил



Аденин

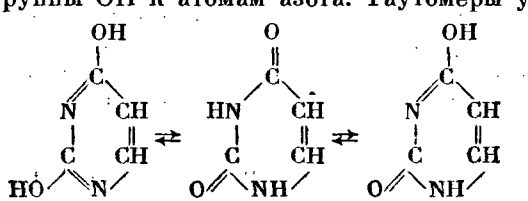


Гуанин

Кроме этих канонических оснований, в ДНК и различных типах РНК встречаются в гораздо меньших количествах производные, минорные основания — 5-метилцитозин, 5-оксиметилцитозин, гипоксантин (гуанин без NH_2-группы, обозначается И) и ксантин (гуанин с группой NH_2, замещенной на ОН).

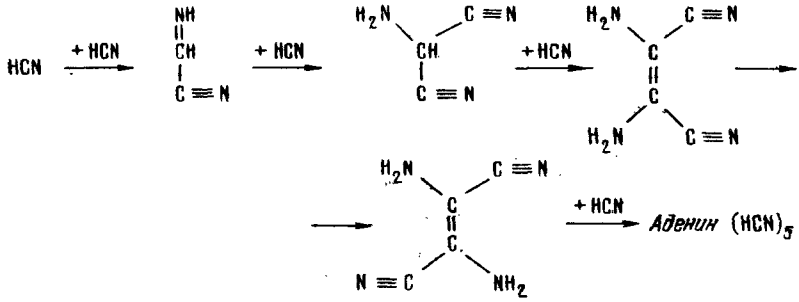
Пиримидины и пурины обладают основными свойствами — их атомы азота могут присоединять протоны, приобретая положительный заряд.

Всем приведенным азотистым основаниям свойственна *таутомерия* — они могут фигурировать в нескольких формах, таутомерах, возникающих в результате перехода атомов водорода гидроксильной группы ОН к атомам азота. Таутомеры урацила:

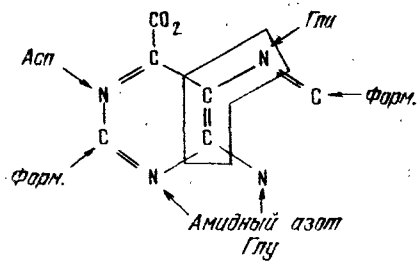


Динамическое равновесие таутомеров, зависящее от температуры, в обычных условиях сдвинуто к кето-форме.

По-видимому, азотистые основания возникли на ранних этапах добиологической эволюции, причем исходным веществом могла быть синильная кислота HCN. Возможная схема первичного синтеза аденина:



Метаболическое происхождение пуринов в современных организмах изображено на схеме



Форм.— муравьиная кислота HCOOH. Первичное происхождение рибозы связано с формальдегидом H_2CO.

Соединения азотистых оснований с рибозой и дезоксирибозой называются *нуклеозидами* — соответственно рибо- и дезоксирибонуклеозидами. Нуклеозиды носят названия цитидина, тимидина, уридина, аденозина и гуанозина. Способ соединения азотистого основания с углеводом показан на рис. 2.5. Фосфорилированные в положениях *5′* и *3′* углевода нуклеозиды называются соответственно нуклеозид-*3′* (или *5′*)-фосфатами или *нуклеотидами.*

Образование нуклеиновой кислоты происходит путем поликонденсации нуклеозидтрифосфатов ЦТФ и т. д. При включении в цепь каждого нуклеотида образуется фосфатная межнуклеотидная связь и выделяется молекула дифосфата — пирофосфорная кислота

$$\text{ЦТФ} + \text{ГТФ} \rightarrow \text{ЦМФ} - \text{ГМФ} + H_4P_2O_7$$

(ТФ — здесь трифосфат, МФ — монофосфат). На рис. 2.5 показано строение цепи ДНК. Цепь РНК построена сходным образом, с тем отличием, что в ней вместо Т фигурирует У и атом Н у С-2′-рибозы заменен на ОН.

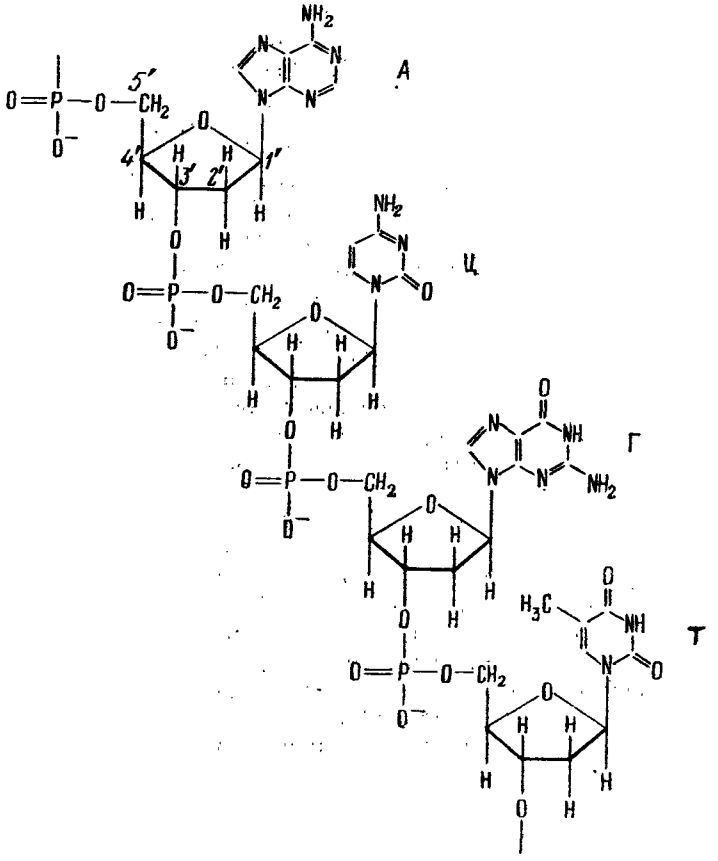


Рис. 2.5. Цепь ДНК

Нуклеотидный состав ДНК подчиняется *правилу Чаргаффа* — содержание А равно содержанию Т, а содержание Ц — содержанию Г:

$$\frac{А + Г}{Т + Ц} \approx 1.$$

Тем самым, количество пуринов в ДНК равно количеству пиримидинов. Вместе с тем

$$\frac{Т + Г}{Ц + А} \approx 1.$$

т. е. количество 6—NH_2-групп в основаниях ДНК равно количеству 6—C=O-групп. Однако отношение

$$\frac{Г+Ц}{А+Т} \approx \frac{Г}{А} \approx \frac{Ц}{Т}$$

отлично от единицы. Оно варьирует в широких пределах у бактерий (от 0,45 до 2,8) и составляет примерно 0,45 у высших животных и растений. Видовая специфичность нуклеотидного состава ДНК была детально изучена Белозерским и его школой. Специфичность выражается не только относительным содержанием Г + Ц, но и содержанием минорных оснований.

РНК не следует правилу Чаргаффа. Отношение (Г + Ц) к (А + У) меняется в широких пределах у любых организмов.

ДНК — вещество генов — содержится в хромосомах и митохондриях клеток, а также в бактериофагах. Молекулярные массы ДНК достигают 10^9 — это самые большие из известных молекул. РНК фигурирует в различных формах, как в ядре, так и в цитоплазме клеток, а также в вирусах и фагах. Существуют четыре типа РНК: высокомолекулярные РНК, а именно рибосомные, рРНК с м.м. порядка 10^6 и матричные, или информационные, мРНК с м.м. от 30 000 и выше. Так как средняя м.м. рибонуклеотида равна 224, самые короткие цепи мРНК содержат примерно 150 нуклеотидов. Третий тип — транспортные тРНК с м.м. порядка 20 000, содержащие около 80 нуклеотидов. Четвертый тип — высокомолекулярные вирусные РНК.

Разработаны прекрасные методы определения первичной структуры, т. е. последовательности нуклеотидов в ДНК и РНК. Эти методы охарактеризованы в § 7.8. С их помощью «прочитаны тексты» многих генов, а также транспортных и других видов РНК. Установление первичной структуры нуклеиновой кислоты является сейчас более простой задачей, чем установление последовательности аминокислотных остатков в белке. Ряд генов уже синтезирован — впервые такой синтез провел Корана в 1970 г.

§ 2.6. Аденилаты

Мономерные фосфорилированные нуклеозиды играют важнейшую роль в метаболизме и биоэнергетике, в регуляции жизнедеятельности на молекулярном уровне. Это яркое свидетельство химического единства живой природы (с. 24), разнообразного использования клетками одних и тех же веществ. Среди нуклеозидов особенно существен аденозин. На рис. 2.6 изображена структура аденозин-5′-моно-, ди- и трифосфата (АМФ, АДФ, АТФ). АТФ является главным аккумулятором химической энергии в клетке. Эта энергия выделяется при гидролитическом отщеплении γ-фосфата в реакции АТФ → АДФ + $Ф_н$ ($Ф_н$ — фосфорная кислота H_3PO_4). Энергия АТФ расходуется на все нужды клетки: для биосинтеза белка, для активного транспорта веществ через мембраны, для производства механической и электриче-

ской работы и т. д. Выделяемая АТФ при отщеплении фосфата свободная энергия $\Delta G^0 = 30{,}7$ кДж/моль. Реже используется свободная энергия других нуклеозидтрифосфатов, прежде всего ГТФ. Конечно, во всех реакциях, использующих энергию АТФ,

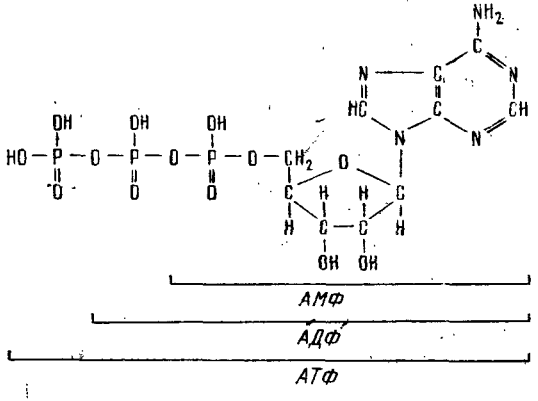


Рис. 2.6. Аденозинмоно-, ди- и трифосфат

действуют ферменты, АТФ-азы, в ряде случаев регулируемые малыми ионами. «Зарядка аккумулятора», т. е. обратная реакция $АДФ + Ф_н \rightarrow АТФ$, происходит в процессах гликолиза, при фотосинтезе и при дыхании (окислительное фосфорилирование).

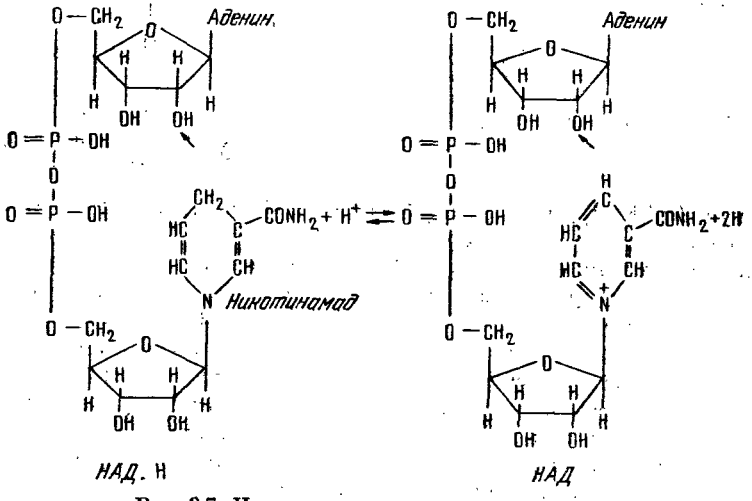


Рис. 2.7. Никотинамидадениндинуклеотид

Во всех этих процессах происходит окисление и восстановление важных коферментов НАД и НАДФ (никотинамидадениндинуклеотид и НАД-фосфат). НАД и НАДФ опять-таки являются аденилатами, производными аденина. На рис. 2.7 показаны взаимопревращения НАД и НАД.Н — реакция $НАД.Н + H^+ \rightleftharpoons 2H +$

+ НАД (стрелкой указана гидроксильная группа, этерифицированная фосфатом в НАДФ и НАДФ.Н).

Метаболизм многих соединений требует их превращения в активированные производные кофермента А (КоА), из которых важнейшее — ацетилкофермент А (ацетил-КоА), показанный на рис. 2.8. Ацетил-КоА служит для переноса ацетильных групп, подобно тому как АТФ — для переноса фосфатных групп. КоА близок по строению к АТФ. Тиоэфирная связь $-CH_2-S-CO-$ так же, как и крайние фосфатные связи в АТФ и АДФ, является энергетической — экзергонической, т. е. такой связью, при расщеплении которой выделяется свободная энергия. Величина ΔG° для гидролиза ацетил-КоА (ацетил-КоА + H_2O → уксусная кислота + КоАSH) составляет −31,5 кДж/моль.

Особенно важную регуляторную роль играет еще один аденилат — *циклический аденозинмоно-*

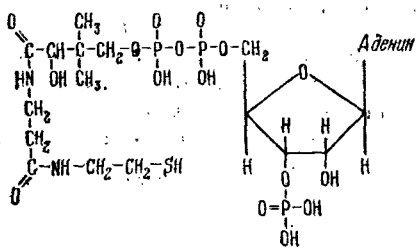


Рис. 2.8. Ацетилкофермент А

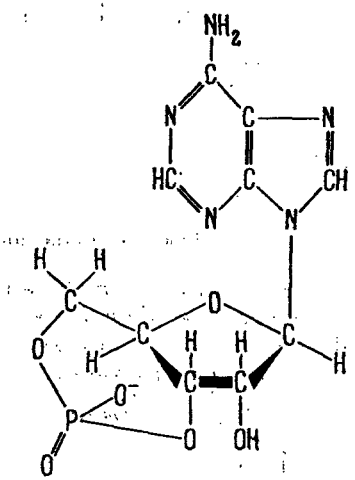


Рис. 2.9. Циклический аденозинмонофосфат

фосфат (цАМФ), который регулирует ферментативные реакции в клетках, запасающих сахара и жиры. С другой стороны, цАМФ регулирует транскрипцию генов (т. е. биосинтез белка) и служит универсальным посредником при действии ряда гормонов, в частности, адреналина (рис. 2.9). Этот аденилат присутствует в клетках в количествах, на три порядка меньших, чем АТФ; цАМФ возникает из АТФ и в свою очередь превращается в инертный нециклический АМФ. Эти малые количества цАМФ все же на два-три порядка больше количества гормона и обеспечивают более чем стократное усиление внешнего гормонального сигнала, воздействующего на клетку.

§ 2.7. Хиральность биологических молекул

Подавляющее большинство сколько-нибудь сложных молекул, содержащих более чем три атома, не имеет плоскости и центра симметрии. Такие молекулы дисимметричны, хиральны. Термин

«*хиральность*» (от древнегреческого хейр — рука, ср. хирургия, хиромантия) означает несовпадение некоторой структуры с ее зеркальным отражением. Хиральные вещества могут фигурировать в двух формах — правой и левой. Эти две конфигурации нельзя совместить друг с другом никаким поворотом системы как целого в пространстве, они относятся друг к другу, как правая и левая руки (рис. 2.10).

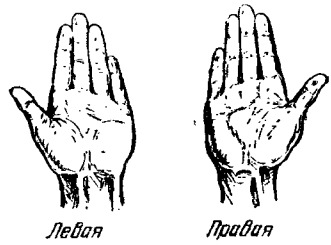


Рис. 2.10. Правая и левая руки

В мире молекул чаще всего приходится встречаться с хиральностью, определяемой так называемым асимметрическим атомом углерода (обычно отмечаемым звездочкой, см. с. 36). В насыщенных (алифатических) органических соединениях четыре валентных связи углерода расположены под тетраэдрическими углами друг к другу. Если две валентности из четырех связывают одинаковые группы, как, например, в молекуле CX_2YZ, то плоскость CYZ является плоскостью симметрии и хиральность отсутствует. Атом углерода асимметричен, если все четыре группы, с которыми он связан, различаются — C*XYZV. Такая молекула не имеет ни плоскости, ни центра симметрии. Тем самым хиральность свойственна 19 каноническим аминокислотам (всем, кроме глицина $H_3N^+ \cdot CH_2 \cdot COO^-$). На рис. 2.11 показаны правая (*D*) и левая (*L*) конфигурации аланина (*зеркальные антиподы* или *энантиомеры*).

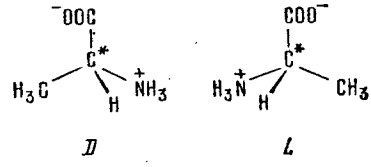


Рис. 2.11. Правая и левая конфигурации аланина

В химическом синтезе из исходных симметричных молекул вещество всегда получается в виде *рацемической смеси*, содержащей по 50% правого и левого антипода. Это следует из второго начала термодинамики — рацемат отвечает максимальной энтропии смешения.

Удивительным свойством живой природы является фиксация в организмах всех важнейших биологических молекул, начиная с аминокислот, в одной определенной конфигурации. Аминокислотные остатки в белках всегда являются «левыми», *L*-формами (рис. 2.11).

Правые и левые формы одинаково реагируют с симметричными молекулами. Они различаются своим взаимодействием с поляризованным светом. Хиральные вещества в отличие от их рацемических смесей вращают плоскость поляризации света в разные стороны и по-разному поглощают свет, поляризованный по кругу вправо и влево (см. гл. 6). Биологические *L*-аминокислоты названы так не потому, что они вращают плоскость поляризации света влево, а *D*-аминокислоты — вправо. Среди *L*-ами-

нокислот есть как лево-, так и правовращающие. Исходным для *L*-ряда органических соединений служит левовращающий глицериновый альдегид ОСН—С*Н(ОН)—CH_2OH. Все *L*-соединения можно в принципе получить из него путем замещения соответствующих атомов и групп, присоединенных к С*, без изменения общей конфигурации молекулы.

Хиральность свойственна и белкам, и углеводам, и нуклеиновым кислотам, и ряду низкомолекулярных соединений в клетке. Углеводы в ДНК и РНК всегда фигурируют в *D*-форме. Азотистые основания имеют плоское строение и, следовательно, лишены хиральности. В процессах метаболизма, происходящих без рацемизации, т. е. без превращений зеркальных антиподов друг в друга, клетка усваивает лишь те из них, которым отвечают структуры ее биологических молекул. Организм усваивает *L*-, но не *D*-аминокислоты. Попав в «антимир», в котором растения и животные содержат молекулы с противоположными конфигурациями, земной организм погиб бы от голода. Для организма *D*- и *L*-антиподы разнятся. Известны вещества, ядовитые в одной форме и безвредные в зеркальной форме; *L*-аспарагиновая кислота безвкусна, ее антипод сладок. Еще Пастер установил, что некоторые бактерии питаются преимущественно одним антиподом данного вещества.

Выделение чистых антиподов *in vitro* из рацемических смесей (асимметрический синтез) осуществляется с помощью хиральных веществ биологического происхождения (обычно алкалоидов). Действуя на рацемическую смесь (*D*, *L*) соединением *L'*, получаем $(D, L)+L' \rightarrow DL'+LL'$. Соединения *DL'* и *LL'* уже не являются зеркальными антиподами (ими были бы *DL'* и *LD'*). Поэтому физико-химические свойства *DL'* и *LL'* различаются, и можно разделить эти соединения, например, кристаллизацией.

Для разделения антиподов необходимо асимметрическое воздействие вещества или существа, знающего разницу между правым и левым. Зеркальные антиподы были открыты Пастером в 1848 г. Он изучал винную кислоту и установил, что у нее имеются правые и левые формы кристаллов. Сортируя их, Пастер получил чистые антиподы винной кислоты. Он играл роль асимметрического фактора — человек сам «хирален» и знает разницу между правым и левым. Хиральность существует в живой природе как на молекулярном, так и на более высоких уровнях организации. Она определяется в конечном счете «хиральной» регуляцией ферментативных процессов. На рис. 2.12 показаны две формы раковины корненожки *Neogloboquadrina pachyderma*. Ракушки, закрученные по часовой стрелке, образуются при температуре, меньшей 7°С, закрученные против часовой стрелки — при более высоких температурах.

В природе хиральность может быть молекулярной или кристаллической. В первом случае она сохраняется при плавлении или растворении вещества (например, сахар), во втором — она свойственна лишь кристаллическому состоянию. Кварц построен

из симметричных молекул SiO_2, но кристаллизуется в правой или левой формах, обладающих противоположной оптической активностью. При плавлении кварца оптическая активность исчезает. В любом месторождении число правых и левых кристаллов в среднем одинаково. Соответственно можно выделить чистый антипод кристаллизацией, поместив в рацемическую смесь нерацемическую правую или левую затравку.

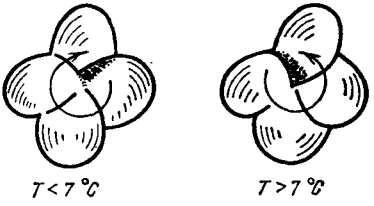


Рис. 2.12. Две формы раковины корненожки *Neogloboquadrina pachyderma*

Возникновение и фиксация хиральности в живой природе представляют исключительный интерес. Попытки объяснить эти факты малой круговой поляризацией света, рассеянного земной атмосферой, или радиоактивным облучением (в связи с несохранением четности в ядерных процессах) не увенчались успехом. Следует рассматривать эти явления в свете общей теории добиологической эволюции, моделирующей возникновение порядка из беспорядка, возникновением информации (гл. 17). Выбор антипода означает создание информации, равной 1 бит на молекулу мономера. Есть веские основания считать, что первоначальное возникновение хиральности было результатом флуктуации. Флуктуационное отклонение от равномерного рацемического распределения может неограниченно нарастать, если система является автокаталитической, т. е. самовоспроизводящейся. Иллюстрируем это модельным расчетом. Пусть x_1 и x_2 — числа молекул полимера (типа РНК), построенного соответственно из D- и L-мономеров, количества которых мы обозначим через m_1 и m_2. Полимеры строят свои копии из мономеров — имеется матричная авторепродукция. Кроме того, полимеры способны распадаться. Кинетические уравнения, описывающие развитие системы, имеют вид

$$\dot{x}_1 = ax_1w_1 - bx_1, \quad \dot{x}_2 = ax_2w_2 - bx_2, \tag{2.22}$$

где a и b — константы скоростей полимеризации и распада,

$$w_1 = m_1/(m_1 + m_2), \quad w_2 = m_2/(m_1 + m_2) \tag{2.23}$$

— вероятности встречи матриц 1 и 2 с мономерами m_1 и m_2 соответственно. В стационарном состоянии $\dot{x}_1 = \dot{x}_2 = 0$, откуда $w_1 = w_2 = b/a$ и, значит, $m_1 = m_2$, т. е. $w_1 = w_2 = 0{,}5$, $a = 2b$ и система рацемична. Нетривиальное развитие системы возможно при неравенстве $m_1 \neq m_2$ в результате флуктуации. Допустим, что

$$w_1 = 0{,}5 + \alpha, \quad w_2 = 0{,}5 - \alpha, \tag{2.24}$$

причем $\alpha > 0$. Тогда решение системы (2.22) имеет вид

$$\begin{aligned} x_1 &= x_1(0)\exp[(a/2 - b)t]\exp(a\alpha t), \\ x_2 &= x_2(0)\exp[(a/2 - b)t]\exp(-a\alpha t). \end{aligned} \tag{2.25}$$

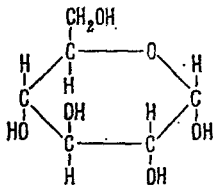
С течением времени популяция x_1 станет доминирующей:

$$\frac{x_1}{x_2} = \frac{x_1(0)}{x_2(0)} \exp(2a\alpha t). \qquad (2.26)$$

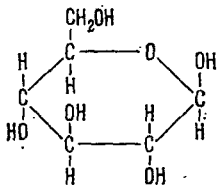
Более подробный анализ проблемы требует привлечения современной теории нелинейных систем (см. гл. 16). Последующая биологическая эволюция означает дальнейшее закрепление хиральности, так как хиральные системы имеют преимущества перед рацемическими — они более специфично взаимодействуют с окружающей средой, отличая правое от левого.

§ 2.8. Углеводы и липиды

Третий вид биополимеров — углеводы, или полисахариды, построенные из моносахаридных звеньев, имеющих в свободном состоянии брутто-формулу $C_6H_{12}O_6$. Моносахариды играют важнейшую роль в метаболизме растений и животных, в частности, *глюкоза*

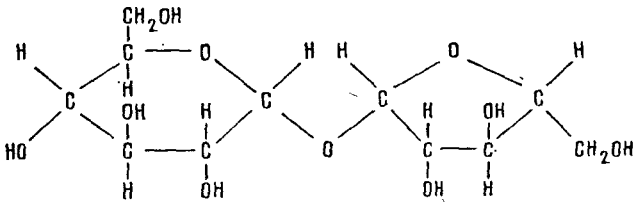


α-D-глюкоза



β-D-глюкоза

Каждый из пяти атомов углерода в кольце асимметричен. В клетках фигурируют и дисахариды $C_{12}H_{22}O_{11}$. Приведем в качестве примера структурную формулу сахарозы (свекловичный и тростниковый сахар):



Важнейшие полисахариды — *крахмал* (две формы: *амилоза* и *амилопектин*) и *целлюлоза* в растениях, *хитин* у членистоногих, *гликоген* в организмах животных. Целлюлоза и хитин служат веществами, образующими скелет, опорные, защитные структуры. Крахмал и гликоген являются веществами, в которых запасается углерод и химическая энергия. На рис. 2.13 изображено звено амилозы. Цепи амилопектина, в отличие от амилозы, разветвлены, равно как и цепи гликогена. Полисахариды не являются

информационными текстами, их структура монотонна. Размеры и разветвленность этих макромолекул варьируют в широких пределах. М.м. амилозы из картофельного крахмала около 10^4 (200 глюкозных звеньев), амилопектина из рисового крахмала около $5 \cdot 10^5$ при 80—90 разветвлениях. М.м. гликогена из мышц

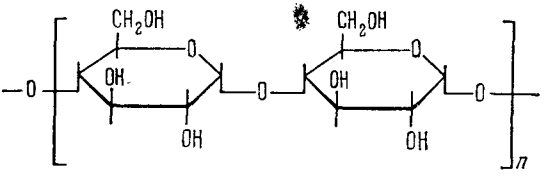


Рис. 2.13. Схема строения амилозы

10^6, из печени — $5 \cdot 10^6$. Целлюлоза хлопка имеет м.м. порядка $5 \cdot 10^5$.

Полисахариды играют важную роль в наружных мембранах некоторых клеток, фигурируют в клеточных оболочках многих видов бактерий. В мембранах полисахариды находятся в комплексах с белками и липидами.

Важнейшая роль жировых веществ — липидов состоит в их обязательном участии в построении и функционировании биологических мембран. Природные жиры, относящиеся к липидам,

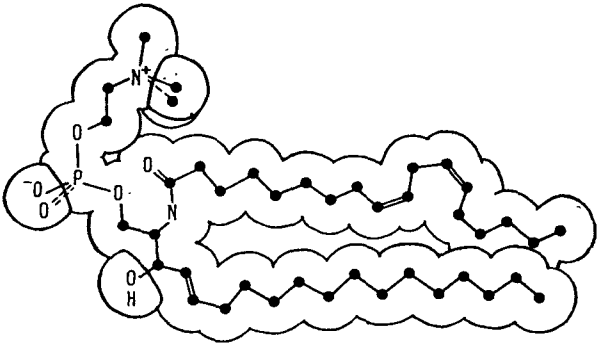


Рис. 2.14. Схема строения липида (сфингомиелина)

представляют собой триглицериды жирных кислот, т. е. их глицериновые эфиры, например триглицерид стеариновой кислоты $H_3C(CH_2)_{16}COOH$:

$$\begin{array}{l} CH_2-O-CO-(CH_2)_{16}CH_3 \\ | \\ CH-O-CO-(CH_2)_{16}CH_3 \\ | \\ CH_2-O-CO-(CH_2)_{16}CH_3 \end{array}$$

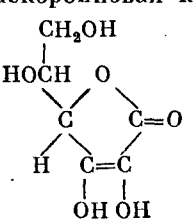
Мы видим, что эти соединения содержат длинные «хвосты» из неполярных углеводородных остатков и сильно полярные «головы» с группами —О—СО—. Функциональные липиды клеточных мембран представляют собой более сложные соединения, в состав которых могут входить и углеводные, и аминные, и алкиламинные группы. Ряд важных соединений относится к *фосфолипидам*. На рис. 2.14 изображена схема строения фосфолипида сфингомиелина. Мембранные липиды и фосфолипиды, как правило, построены из сильно полярной «головы» и двух длинных неполярных углеводородных «хвостов». Для их функции существенно присутствие в «хвостах» ненасыщенных двойных C=C-связей. Такие связи отсутствуют в животных жирах, но наличествуют в растительных. Функционирование липидов в мембранах описано в гл. 10.

§ 2.9. Кофакторы, витамины, гормоны

Метаболизм в целом, равно как и специальные свойства биополимеров в клетках регулируются специфическими малыми молекулами, относящимися к нескольким группам органических соединений. В § 2.5 уже говорилось об аденилатах.

Бóльшая часть ферментов функционирует в комплексах с низкомолекулярными *кофакторами*, *коферментами*. Такой фермент в целом называется *холоферментом*, его белковая часть — *апоферментом*. Кофакторы разнообразны. К алифатическому ряду относятся дифосфаты углеводов и их аминопроизводных, участвующие в реакциях переноса фосфатных групп. Среди алифатических кофакторов отметим содержащие серу липоевую кислоту и глутатион.

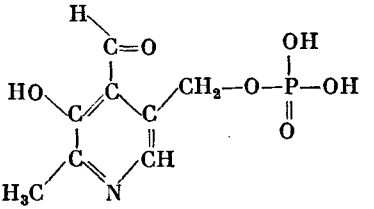
Необходимым участником ряда окислительно-восстановительных процессов является аскорбиновая кислота, или витамин C:



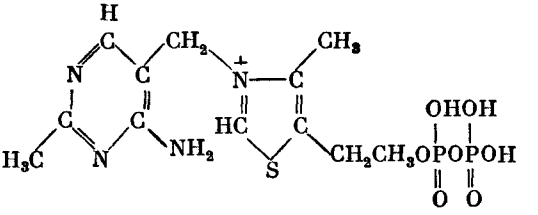
Витамины необходимы именно потому, что они служат кофакторами или преобразуются в них. Так как роль кофакторов каталитическая, они нужны организму в малых количествах.

В то время как основные цепи белков и нуклеиновых кислот, не говоря уже о полисахаридах, не являются цепями сопряженных π-связей, большинство важнейших коферментов — π-электронные сопряженные системы, содержащие ароматические циклы или гетероциклы. Таковы, как мы уже видели, аденилаты. Во флавиновых коферментах — во флавинмононуклеотиде ФМН и флавинадениндинуклеотиде ФАД фигурирует сопряженный

трехкольцевой гетероцикл — рибофлавин (витамин B_2). Эти коферменты окрашены в желто-оранжевый цвет, так как рибофлавин поглощает свет в видимой области спектра. Аденин входит и в состав кобамидных коферментов, связанных с кобаламином или B_{12}. Пиридоксальфосфат (ПАЛФ) — производное пиридина — является коферментом трансаминаз, катализирующих превращения аминокислот:



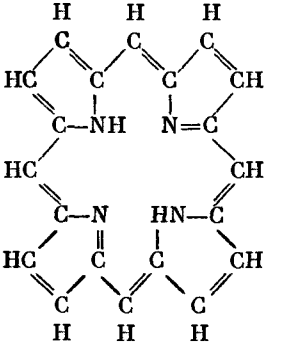
π-электронная система фигурирует и в тиаминфосфате



Тиамин есть витамин B_1.

Длинная линейная сопряженная система π-связей содержится в красящем веществе моркови — в *β-каротине*, являющемся провитамином А. Его модификация — *ретиналь* — непосредственно участвует в первичном акте зрительного восприятия (гл. 14).

Важнейшее значение для ряда жизненных процессов, начиная с фотосинтеза, имеют π-электронные сопряженные системы *порфириновых соединений* — производные *порфина*



Порфириновое кольцо построено из четырех пятичленных пиррольных гетероциклов. Как и другие сопряженные системы, пор-

фириновое кольцо — плоское. В центре кольца может располагаться координационно связанный атом металла. В упомянутых кобамидных ферментах фигурирует порфирин с атомом Co в центре. Хлорофиллы, ответственные за первичные акты поглощения света при фотосинтезе, содержат порфирин с центральным атомом Mg (см. § 14.1). Простетическая группа гема — порфирина с центральным атомом Fe — содержится в белках, участвующих в процессах дыхания — в цитохромах (см. § 13.6), в миоглобине и гемоглобине (§ 6.7), в леггемоглобине — белке клубеньковых бактерий, участвующем в фиксации атмосферного азота, в ряде окислительно-восстановительных ферментов. В крови оболочников (асцидий) содержится половинка порфирина — дипиррольный комплекс ванадия.

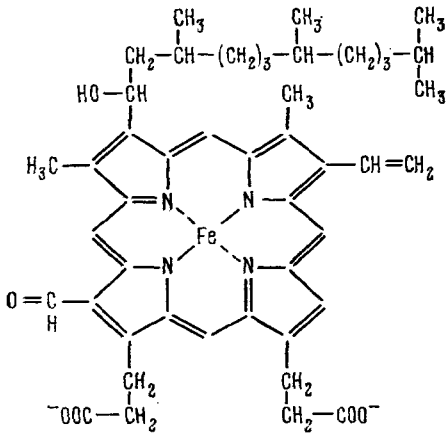
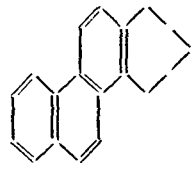


Рис. 2.15. Гем (протогем IX)

На рис. 2.15 показана структура гема простетической группы миоглобина и гемоглобина.

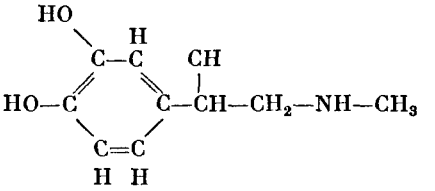
Роль металлов, в частности комплексообразующих переходных металлов, очень велика в биологии. Около трети всех ферментов, известных науке, содержит ионы металлов в качестве кофакторов. Относящиеся сюда факты и проблемы, представляющие собой предмет *бионеорганической химии*, рассмотрены в § 6.9.

В сложных многоклеточных организмах роль сигнальных, регуляторных веществ играют *гормоны*. В организмах животных имеются две большие группы гормонов — белки, полипептиды и их производные и стероиды. К первой группе относится тиреоглобулин — белок щитовидной железы, содержащий иодированный тироксин, инсулин, регулирующий уровень сахара в крови, окситоцин, вызывающий сокращение матки, вазопрессин, регулирующий кровяное давление, и т. д. Гормоны синтезируются в железах внутренней секреции и осуществляют регуляцию на уровне организма. Стероиды — соединения, содержащие углеродный скелет циклопентанофенантрена



Важнейшие стероидные гормоны — половые гормоны — эстрон, прогестерон, тестостерон, андростерон и гормон коры надпочечников — кортизон.

Кроме этих двух групп, имеются и другие низкомолекулярные гормоны. Укажем на адреналин, гормон надпочечников, повышающий артериальное давление и стимулирующий сердечную деятельность:



Гормональная активность определяется химической функциональностью немногочисленных атомных групп. Химические различия тестостерона и кортизона малы, но их физиологические функции совершенно различны. Строение и свойства гормонов

Таблица 2.3. **Приблизительный химический состав клеток *E. coli***

Вещество	Средняя м. м.	Число молекул в клетке	Число различных видов молекул
H_2O	18	$10 \cdot 10^{10}$	1
Неорганические ионы (Na^+, K^+, Mg^{++}, Ca^{++}, Cl^-, PO_4^{3-}, CO_3^{--} и др.)	40	$2{,}5 \cdot 10^8$	20
Углеводы и их предшественники	150	$2 \cdot 10^8$	200
Аминокислоты и их предшественники	120	$3 \cdot 10^7$	100
Нуклеотиды и их предшественники	300	$1{,}2 \cdot 10^7$	200
Липиды и их предшественники	750	$2{,}5 \cdot 10^7$	50
Другие малые молекулы	150	$1{,}5 \cdot 10^7$	200
Белки	$4 \cdot 10^4$	10^6	$2—3 \cdot 10^3$
ДНК	$2{,}5 \cdot 10^9$	4	1
РНК:			
рРНК 16 S*)	$5 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^4$	1 (?)
рРНК 23 S	10^6	$3 \cdot 10^4$	1 (?)
тРНК	$2{,}5 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^4$	40
мРНК	10^6	10^3	10^3

*) S — сведберг (см. с. 80).

демонстрируют биологическое значение индивидуальных молекулярных структур.

Важную роль играют олигопептиды головного мозга млекопитающих. Вещества, содержащие небольшое число аминокислотных остатков (например, действующий подобно морфину ундекапептид Н-Арг-Про-Лиз-Про-Глн-Глн-Фен-Фен-Гли-Лей-Мет-NH_2),

обладают различными функциями — среди них имеются анальгетики, стимуляторы памяти и сна.

К веществам полипептидной природы относится ряд нейротоксинов, содержащихся в ядах змей, скорпионов и т. д. Эти вещества блокируют синаптическую передачу нервного импульса (см. § 11.5).

Табл. 2.3 характеризует разнообразие веществ, функционирующих в бактериальной клетке *Escherichia coli* (кишечной палочке).

§ 2.10. Основные биохимические процессы

Все кратко охарактеризованные выше вещества участвуют в процессах жизнедеятельности различных организмов, выработанных в ходе биологической эволюции. Большие и малые биологические молекулы обеспечивают биосинтез, метаболизм и биоэнергетику.

Как уже сказано, нуклеиновые кислоты ответственны за биосинтез белков. В этом и состоит их единственная «законодательная» функция. В свою очередь «исполнители» — белки — являются необходимыми участниками всех биохимических процессов в качестве катализаторов — ферментов.

Для реализации биосинтеза и метаболизма необходима энергия, запасаемая в клетках в химической форме, главным образом в экзергонических третьей и второй фосфатной связи АТФ. Соответственно метаболические биоэнергетические процессы имеют своим результатом «зарядку аккумулятора» — синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата. Это происходит в процессах дыхания и фотосинтеза. Современные организмы несут память об эволюции, начавшейся около $3{,}5 \cdot 10^9$ лет назад. Имеются веские основания считать, что жизнь на Земле возникла в отсутствие свободного кислорода (см. § 17.2). Метаболические процессы, протекающие при участии кислорода (прежде всего окислительное фосфорилирование при дыхании), относительно немногочисленны и эволюционно являются более поздними, чем анаэробные процессы. В отсутствие кислорода невозможно полное сгорание (окисление) органических молекул пищевых веществ. Тем не менее, как это показывают свойства ныне существующих анаэробных клеток, и в них необходимая для жизни энергия получается в ходе окислительно-восстановительных процессов. В аэробных системах конечным акцептором (т. е. окислителем) водорода служит O_2, в анаэробных — другие вещества. Окисление без O_2 реализуется в двух путях брожения — в гликолизе и в спиртовом брожении. *Гликолиз* состоит в многостадийном расщеплении гексоз (например, глюкозы) вплоть до двух молекул пирувата (пировиноградной кислоты), содержащих по три атома углерода. На этом пути две молекулы НАД восстанавливаются до НАД.Н и две молекулы АДФ фосфорилируются — получаются две молекулы АТФ. Вследствие обратной реакции

НАД.Н → НАД + Н из пирувата получается лактат (молочная кислота). При спиртовом брожении из пирувата получается этиловый спирт. Попутно выделяется CO_2. Суммарные реакции:

$$C_6H_{12}O_6 + 4НАД + 2АДФ + 2Ф \rightarrow \underset{\text{пируват}}{2H_3C\cdot CO\cdot COOH} + 4НАД.Н + 2АТФ.$$

$$2H_3C\cdot CO\cdot COOH + 4НАД.Н \rightarrow \underset{\text{лактат}}{2H_3C\cdot CH(OH)\cdot COOH} + 4НАД,$$

$$2H_3C\cdot CO\cdot COOH + 4НАД.Н \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 4НАД.$$

Побочной стадией гликолитического и спиртового брожения является так называемый пентозофосфатный путь, на котором происходит расщепление воды и также выделение CO_2.

Благодаря присутствию во внешней среде CO_2 оказался возможным *фотосинтез*. Бактериальный фотосинтез, а затем и фотосинтез зеленых растений развивались примерно $3—2\cdot10^9$ лет назад. Фотосинтез состоит в поглощении света и преобразовании его энергии в химическую энергию биологических молекул. Для этого потребовались поглощающие свет соединения, в частности, содержащие порфириновые циклы — хлорофилл и цитохромы. В результате поглощения квантов света в хлорофилле электроны системы переходят на более высокие уровни энергии. Далее работает цепь переноса электронов, главными участниками которой являются окислительно-восстановительные ферменты — цитохромы. Запасенная первоначально в хлорофилле энергия выделяется в биологически полезной форме — в АТФ и НАДФ. Происходит фотофосфорилирование.

По-видимому, на более поздней стадии эволюции возникло фотосинтетическое восстановление CO_2 до углеводов. При этом источником Н у прокариот (бактериальный фотосинтез) служат разные молекулы, а у зеленых растений H_2O. В окружающую среду выделяется кислород. Его накопление в атмосфере является результатом фотосинтеза. Суммарная реакция:

$$6CO_2 + 12H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6H_2O + 6O_2.$$

Примерно $1{,}5—2\cdot10^9$ лет назад парциальное давление O_2 в атмосфере достигло 0,02—0,20% современного уровня. При этом начал возникать аэробный метаболизм, дыхание. При клеточном дыхании происходит ряд взаимосвязанных процессов синтеза биологических молекул, необходимых для жизни, и «зарядка» АТФ (окислительное фосфорилирование). Молекулы пищевых веществ «сгорают», окисляются до CO_2 и H_2O, причем O_2 служит конечным акцептором водорода. Освобождение химической энергии из пищи происходит, грубо говоря, в трех фазах. Первая состоит в расщеплении макромолекул и молекул жиров. Из белков получаются аминокислоты, из углеводов (крахмал, гликоген) — гексозы, из жиров — глицерин и жирные кислоты. Из этих веществ

во второй стадии образуются ацетилкофермент А (с. 42), α-кетоглутарат и оксалоацетат. В третьей фазе реализуется *цикл Кребса*, представленный на с. 424. Цикл Кребса начинается реакцией оксалоацетата с ацетил-КоА и тот же оксалоацетат регенерируется при обороте по циклу. Определенные реакции цикла, выполняющего каталитическую функцию, сопровождаются переносом атомов Н на НАД или флавопротеид. На каждые два электрона, перенесенные с НАД.Н на O_2, синтезируются три молекулы АТФ (*окислительное фосфорилирование*). Этот перенос электронов осуществляется в дыхательной цепи. При переходе от первой фазы ко второй выделяется CO_2, при переносе электронов с НАД · Н на O_2 образуется H_2O. Общий баланс процесса аэробного дыхания

$$C_6H_{12}O_6 + 6H_2O + 6O_2 + 36АДФ + 36Ф \rightarrow 6CO_2 + 12H_2O + 36АТФ.$$

Дыхание много эффективнее гликолиза. При гликолизе изменение свободной энергии на моль глюкозы составляет — 197 кДж, при дыхании — 2880 кДж.

Сложные процессы метаболизма, запасания и расходования энергии пространственно локализованы в клетках. Дыхание реализуется в мембранах митохондрий, фотосинтез — в мембранах хлоропластов. Биохимические процессы эволюционно адаптированы. Так, у животных пустынь и у птиц главным источником метаболической энергии является жир, а не гликоген. В пустыне надо обеспечивать не только максимальный выход энергии, но и максимум образования воды — при окислении жира производится вдвое больше воды, чем при окислении гликогена. Для птиц существенна меньшая масса жира. Масса гликогена и связанной с ним воды в 8 раз больше, чем масса жира, дающая при окислении то же количество энергии.

Подробное рассмотрение и схемы всех метаболических путей содержатся в руководствах по биохимии. Мы вернемся к дыханию и фотосинтезу в гл. 13, посвященной биоэнергетике, и в гл. 14, посвященной фотобиологическим процессам.

§ 2.11. Сильные и слабые взаимодействия

Взаимодействия атомов в биологических молекулах, равно как и в молекулах синтетических органических соединений,— это прежде всего химические ковалентные связи, которые мы назовем сильными. Энергия, необходимая для разрыва С—С-связи, равна 348,6 кДж/моль, энергия С—N-связи 336 кДж/моль и т. д. Сильные взаимодействия определяют цепное строение биополимеров, соединение друг с другом соответствующих мономеров — аминокислотных остатков, нуклеотидов, гексоз. Сильные связи образуются внешними электронами атомов; теория ковалентных связей может быть основана только на квантовой механике. Соответствующая область физики или теоретической химии именуется *квантовой химией*.

В ходе биохимических реакций, катализируемых ферментами, происходит перестройка химических связей, перестройка электронных оболочек.

Однако биологические молекулы не могли бы функционировать и жизнь в известных нам формах не существовала бы, если бы помимо сильных взаимодействий внутри биологических молекул и между ними не действовали бы невалентные, нехимические, слабые силы. Клетки и их органоиды — гетерогенные системы, существование и функционирование которых определяются межмолекулярными взаимодействиями невалентного характера. Исполнители почти всех молекулярных функций в клетках — белки — взаимодействуют с липидами и углеводами, с нуклеиновыми кислотами и с малыми молекулами. Взаимодействия эти преимущественно слабые, так как сильные взаимодействия создавали бы слишком жесткие и устойчивые структуры, лишенные молекулярной подвижности, необходимой для выполнения биологическими молекулами их разнообразных задач, включающих тонкую регуляцию химических реакций, компартментацию, установление градиентов концентрации. Перечислим виды слабых взаимодействий в биологических системах и охарактеризуем их.

1. *Ионные связи.* Силы взаимодействия между ионами, описываемые законом Кулона. Энергия взаимодействия двух ионов с зарядами e_1 и e_2 равна

$$U_{\text{ион}} = \frac{e_1 e_2}{\varepsilon r}, \tag{2.27}$$

где r — расстояние между ионами, ε — диэлектрическая проницаемость среды. Разноименные заряды притягиваются, $U_{\text{ион}} < 0$, одноименные отталкиваются, $U_{\text{ион}} > 0$. Ионные связи образуются, в частности, между ионогенными группами в белках (например, Глу^-, Лиз^+), между такими группами и малыми противоионами, между фосфатными группами в нуклеиновых кислотах и катионами т. д.

2. *Ион-дипольные взаимодействия* между ионами и полярными группами молекул. Они определяются зарядом иона и дипольным моментом взаимодействующей с ним атомной группы.

3. *Ориентационные силы.* Электростатические взаимодействия между диполями. Дипольный момент p малой молекулы или атомной группы равен по порядку величины произведению заряда электрона ($4{,}8 \cdot 10^{-10}$ ед. СГСЭ) на длину химической связи ($\sim 10^{-8}$ см). Единица дипольного момента, равная 10^{-18} ед. СГСЭ, называется дебаем (D). Диполи стремятся установиться антипараллельно или «в хвост» друг к другу. Энергия ориентационного взаимодействия двух диполей обратно пропорциональна кубу расстояния между ними:

$$U_{\text{ор}} = \frac{1}{r^3}\left\{\mathbf{p}_1\mathbf{p}_2 - \frac{3(\mathbf{p}_1\mathbf{r})(\mathbf{p}_2\mathbf{r})}{r^2}\right\}. \tag{2.28}$$

Если два диполя установлены «в хвост» друг к другу, т. е. все три вектора $\mathbf{p}_1$, $\mathbf{p}_2$ и $\mathbf{r}$ коллинеарны, то

$$U_{\text{ор}} = -2p_1p_2/r^3. \qquad (2.29)$$

Если дипольные молекулы находятся в состоянии теплового движения в газе или в жидкости, то выражение (2.28) следует усреднить по всем взаимным ориентациям диполей с учетом больцманова фактора $\exp(-U/\kappa T)$. При достаточно высокой температуре, когда $U \ll \kappa T$, усреднение дает

$$U_{\text{ор}} = -\frac{2p_1^2p_2^2}{3\kappa T r^6}. \qquad (2.30)$$

4. *Индукционные силы.* Постоянный диполь молекулы или атомной группы индуцирует в другой молекуле или группе атомов дипольный момент, с которым он взаимодействует. Дипольный момент, индуцированный электрическим полем с напряженностью $\mathbf{E}$, равен

$$\mathbf{p} = a\mathbf{E}, \qquad (2.31)$$

где a — поляризуемость, характеризующая способность электронной оболочки смещаться под действием электрического поля. Поляризуемость имеет размерность объема, порядок величины поляризуемости атомов и малых молекул тот же, что их объемов, т. е. 10^{-24} см^3. В нашем случае напряженность электрического поля диполя в молекуле, отстоящей от него на расстояние r, есть $E = 2p/r^3$ (если $\mathbf{p}$ и $\mathbf{r}$ параллельны), и энергия индукционного взаимодействия равна

$$U_{\text{инд}} = -{}^1/_2aE^2 = -2ap^2/r^6. \qquad (2.32)$$

Подобно $U_{\text{ор}}$, энергия индукционного взаимодействия обратно пропорциональна шестой степени расстояния, но от температуры не зависит.

Формулы (2.28) — (2.32) справедливы лишь для точечных диполей, т. е. при условии $p \ll er$, где e — заряд электрона. Если это условие не выполнено, то необходимо проводить расчет взаимодействия точечных зарядов, *монополей*.

Перечисленные взаимодействия являются электростатическими, энергия притяжения или отталкивания вычисляется на основе классической электростатики. Квантовые эффекты практически не существенны.

5. *Дисперсионные силы.* Взаимодействие валентно насыщенных электронных оболочек атомов и молекул. Это силы, не зависящие от наличия зарядов, дипольных моментов, квадрупольных моментов и т. д. Таковы, например, силы, действующие между молекулами N_2, O_2, CO_2, благородных газов в их смеси (воздух) и порознь. Эти силы определяют неидеальное поведение бездипольных газов, их сжижение. Дисперсионные силы ответственны за существование молекулярных кристаллов, в частности, кристаллов углеводородов. Дисперсионные силы имеют квантовоме-

ханическую природу, в рамках классической физики нельзя объяснить их существование.

Элементарный расчет энергии дисперсионного взаимодействия исходит из представления электронов гармоническими осцилляторами. Между двумя одинаковыми осцилляторами реализуется мгновенное диполь-дипольное взаимодействие, вследствие чего вместо первоначального колебания с частотой ω_0 возникают два нормальных колебания с частотами, которые отличаются от ω_0 тем больше, чем сильнее взаимодействие. Соответственно изменяется и нулевая энергия колебаний. В отсутствие взаимодействия она равна

$$\mathscr{E}_0^0 = 6\,\frac{\hbar\omega_0}{2}, \tag{2.33}$$

$\hbar$ — постоянная Планка. Множитель 6 получается потому, что каждый электрон-осциллятор предполагается имеющим три степени свободы. При взаимодействии нулевая энергия колебаний равна

$$\mathscr{E}_0 = \frac{1}{2}\hbar\omega_0\left\{2\left[\left(1+\frac{e^2}{fr^3}\right)^{1/2}+\left(1-\frac{e^2}{fr^3}\right)^{1/2}\right]+\right.$$
$$\left.+\left(1+\frac{2e^2}{fr^3}\right)^{1/2}+\left(1-\frac{2e^2}{fr^3}\right)^{1/2}\right\}, \tag{2.34}$$

где e — заряд электрона, f — коэффициент упругости осциллятора, r — расстояние между осцилляторами. При $e^2/fr^3 \ll 1$

$$\mathscr{E}_0 \approx 3\hbar\omega_0 - \frac{3}{4}\,\hbar\omega_0\frac{e^4}{f^2r^6}, \tag{2.35}$$

и, следовательно, энергия взаимодействия равна

$$U_{\text{дисп}} = \mathscr{E}_0 - \mathscr{E}_0^0 = -\frac{3}{4}\,\hbar\omega_0\frac{e^4}{f^2r^6}. \tag{2.36}$$

Поместим электрон-осциллятор в электрическое поле $\mathbf{E}$. Сила $e\mathbf{E}$, действующая на электрон, уравновешивается упругой силой $f\mathbf{r}$. Следовательно, индуцированный дипольный момент равен

$$\mathbf{p} = e\mathbf{r} = \frac{e^2}{f}\,\mathbf{E} = a\mathbf{E}, \tag{2.37}$$

где a — поляризуемость осциллятора, равная

$$a = \frac{e^2}{f} = \frac{e^2}{m\omega_0^2} \tag{2.38}$$

(m — масса осциллятора). Подставляя a в выражение (2.36), получаем

$$U_{\text{дисп}} = -\frac{3}{4}\,\hbar\omega_0\frac{a^2}{r^6}. \tag{2.39}$$

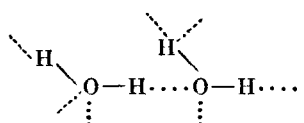
Энергия дисперсионного взаимодействия также обратно пропорциональна шестой степени расстояния между взаимодействующими системами. Наличие множителя $\hbar$ в выражении (2.39) свидетельствует о квантовомеханической природе дисперсионных сил, впервые раскрытой Лондоном.

Дисперсионные силы имеют универсальное значение для внутри- и межмолекулярных взаимодействий атомных групп и молекул с насыщенными валентными связями.

Силы 3, 4, 5 принято называть ван-дер-ваальсовыми, так как в сумме они определяют межмолекулярное притяжение, ответственное за поправку на давление в уравнении Ван-дер-Ваальса для реальных газов. Поправка на объем определяется взаимным отталкиванием молекул на малых расстояниях, природа которого также квантовомеханическая.

Порядок величины энергии ван-дер-ваальсовых взаимодействий соответствует теплоте испарения жидкости. Она имеет порядок величины 10 кДж/моль.

6. *Водородные связи.* Специфические донорно-акцепторные взаимодействия, создаваемые атомом H в группах O—H, N—H, F—H, Cl—H, иногда в S—H. Водород связывает эти группы с валентно насыщенными атомами O, N, F, например, в воде:



Водородные связи определяют строение и свойства воды, они играют очень важную роль в формировании структур биополимеров и в их взаимодействиях с малыми молекулами. Энергии водородных связей имеют порядок 4—29 кДж/моль. Подробнее о них рассказано в § 4.3.

7. *Гидрофобные взаимодействия.* Биополимеры — белки и нуклеиновые кислоты — функционируют главным образом в водном окружении. Гидрофобные силы — силы специфического отталкивания между неполярными атомными группами и молекулами воды. Это энтропийный эффект, определяемый особенностями структуры воды как конденсированной системы. Гидрофобные взаимодействия играют важнейшую роль в формировании структуры белков, надмолекулярных систем (мембраны) и т. д.

О гидрофобных взаимодействиях рассказано в § 4.5.

Слабые взаимодействия ответственны за молекулярную гибкость, т. е. конформационные свойства биополимеров и малых молекул (см. гл. 3). Ими определяется молекулярное узнавание, реализуемое в ферментативном катализе (гл. 6), в биосинтезе (гл. 8) и в целом ряде биологических процессов, происходящих на молекулярном уровне.

Глава 3

ФИЗИКА МАКРОМОЛЕКУЛ

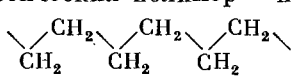
§ 3.1. Макромолекулы и высокоэластичность

Биологические макромолекулы — белки и нуклеиновые кислоты — очень сложны. Их свойства в живых системах определяются всеми особенностями строения, в частности, тем, что эти макромолекулы являются *информационными*, они представляют собой «тексты». Важно установить, что́ в поведении биополимеров связано с самим фактом их цепочечного строения, независимо от конкретных атомных групп, входящих в состав макромолекулы. Простые неинформационные цепи синтетических полимеров служат моделями для исследования этой проблемы.

Как уже сказано, физика макромолекул — одна из основ молекулярной биофизики.

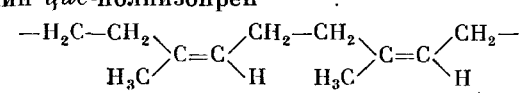
Полимеры синтезируются химическими методами или добываются из растений (каучук, целлюлоза) главным образом ради их ценных физических свойств. В технике полимеры применяются как пластмассы, изоляторы, волокна и высокоэластичные материалы — природный и синтетический каучуки.

Простейший синтетический полимер — полиэтилен



получаемый *полимеризацией* этилена $H_2C{=}CH_2$, идущей путем раскрытия двойных связей.

Сходным образом получается аналог природного каучука — синтетический *цис*-полиизопрен



в результате полимеризации изопрена $H_2C{=}C(CH_3){-}CH{=}CH_2$. Ряд полимеров, в частности, найлон и ему подобные, синтезируются путем *поликонденсации*, идущей с выделением какого-либо вещества. Как мы видели, полипептидная цепь получается путем поликонденсации аминокислот, идущей с выделением воды, полинуклеотидная — путем поликонденсации нуклеозидтрифосфатов с выделением пирофосфата.

Специфическим свойством полимеров, наиболее важным для биофизики, является *высокоэластичность* — способность блочного

каучукоподобного полимера испытывать большие упругие деформации, достигающие сотен процентов, при малом модуле упругости. Каучук, подобно другим упругим телам, подчиняется при малых деформациях закону Гука — напряжение пропорционально относительной деформации:

$$\sigma = \varepsilon \frac{L - L_0}{L_0}. \tag{3.1}$$

Здесь σ — напряжение, L, L_0 — длины растянутого и нерастянутого образцов, ε — модуль упругости. Для стали $\varepsilon \approx 200\,000$ МПа, для резин $\varepsilon \approx 0{,}2$—$8$ МПа (в зависимости от степени вулканизации каучука). В этом смысле каучук похож на идеальный газ. Идеальный газ следует закону Клапейрона

$$pV = RT. \tag{3.2}$$

Сожмем газ, находящийся в цилиндре с поршнем, при постоянной температуре, увеличив давление на dp. Объем уменьшится на dV. Из (3.2) следует

$$dp = -p\frac{dV}{V} = p\frac{L_0 - L}{L_0}, \tag{3.3}$$

где L_0 — начальное, L — конечное положение поршня. Уравнение (3.3) аналогично (3.1), роль модуля упругости ε играет давление p. Атмосферному давлению отвечает $\varepsilon = 100$ кПа — величина того же порядка, что и модуль упругости каучука. Идеальный газ нагревается при адиабатическом сжатии. Аналогичным образом резина нагревается при адиабатическом растяжении. Это означает, что в обоих случаях при деформации происходит уменьшение энтропии. Работа при растяжении каучука на длину dL силой f равна

$$f\,dL = dF = dE - T\,dS, \tag{3.4}$$

где F — свободная энергия, E — внутренняя энергия, S — энтропия. Каучук практически несжимаем. Упругая сила при изотермическом растяжении каучука равна

$$f = \left(\frac{\partial F}{\partial L}\right)_T = \left(\frac{\partial E}{\partial L}\right)_T - T\left(\frac{\partial S}{\partial L}\right)_T. \tag{3.5}$$

Опыт показывает, что для каучука сила f пропорциональна T, причем прямая $f(T)$ проходит вблизи начала координат. Иными словами,

$$\left(\frac{\partial E}{\partial L}\right)_T \approx 0. \tag{3.6}$$

Подобно тому как внутренняя энергия идеального газа не зависит от объема

$$\left(\frac{\partial E}{\partial V}\right)_T = 0, \tag{3.7}$$

внутренняя энергия каучука не зависит от длины. Упругая сила и в том, и в другом случае определяется изменением не внутренней энергии, а энтропии. Для каучука

$$f \approx -T\left(\frac{\partial S}{\partial L}\right)_T. \tag{3.8}$$

В этом и состоит принципиальное отличие высокоэластичности полимера от упругости твердого тела (скажем, стальной пружины), определяемой изменением внутренней энергии.

Почему же каучук похож на идеальный газ? Энтропийный характер упругости идеального газа означает, что при уменьшении объема газа возрастает число ударов молекул о стенки — упругая сила определяется тепловым движением молекул. Сжатие газа уменьшает его энтропию, так как газ переходит из более вероятного разреженного состояния в менее вероятное — сжатое. Поэтому модуль упругости идеального газа пропорционален абсолютной температуре:

$$p = \frac{R}{V}T.$$

Пропорциональность модуля упругости каучука абсолютной температуре, следующая из (3.8), также свидетельствует об энтропийной природе высокоэластичности, о том, что каучук состоит из большого числа независимых элементов, подверженных тепловому движению. Переход от более вероятного расположения этих элементов к менее вероятному происходит при растяжении каучука. Аналогия между свойствами каучука и идеального газа может состоять только в сказанном. Но что это за элементы? Что в каучуке играет роль молекул газа?

Отличие макромолекул от малых молекул определяется прежде всего большим числом однотипных звеньев, связанных в линейную цепь. Как правило, макромолекулы содержат единичные σ-связи C—C, C—N, C—O и др. Вокруг этих связей возможны повороты атомных групп. В результате поворотов вокруг единичных связей возникают различные конформации цепи. Макромолекула обладает конформационной лабильностью, той или иной степенью гибкости. Роль независимо движущихся элементов играют участки цепи, совершающие независимые повороты. Как мы увидим, конформационные свойства биологических молекул очень важны.

Знакомство с этими свойствами нужно начинать с изучения каучука. Следуя таким путем, мы, в конечном счете, придем к пониманию природы ферментативной активности.

Ландау говорил, что задача физики состоит в установлении новых связей между далекими друг от друга явлениями. Мы уже установили, что́ связывает каучук с идеальным газом. Далее мы увидим, что́ связывает фермент с каучуком.

§ 3.2. Внутреннее вращение и поворотная изомерия

Классическая органическая химия считала свободным вращение атомных групп вокруг единичных связей. Любые *конформации*, например, этана $H_3C—CH_3$, возникающие в результате внутренних поворотов, имеют одинаковую энергию; изменение

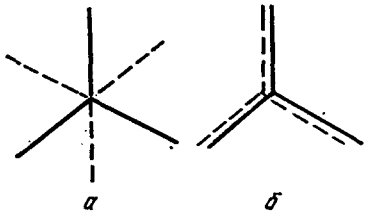


Рис. 3.1. Расположение С — Н-связей этана в транс- (*а*) и цис- (*б*) конформациях. Проекции на плоскость, перпендикулярную С — С-связи

угла поворота не требует затраты энергии. Некоторые из конформаций этана изображены на рис. 3.1.

Однако исследования термодинамических свойств этана и других соединений с единичными связями, а также структурные исследования, проведенные методами спектроскопии, ЯМР и т. д., показали, что внутреннее вращение почти всегда несвободно. Молекула этана имеет минимум энергии в *транс-*, или скрещен-

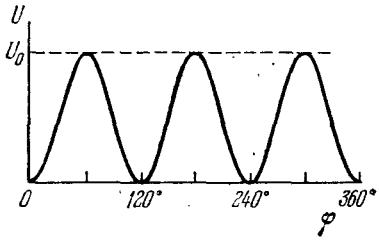


Рис. 3.2. Зависимость потенциальной энергии внутреннего вращения в этане от угла поворота

ной, конформации (рис. 3.1, *а*) и максимум в *цис-*, или затененной, конформации. Для поворота вокруг С—С-связи на 120°, т. е. для перехода из одной *транс*-конформации в другую, ей тождественную, нужно преодолеть энергетический барьер, равный 12 200 Дж/моль. Для этана, а также для других молекул с осевой симметрией C_3 зависимость потенциальной энергии молекулы от угла поворота φ можно приближенно представить формулой

$$U = {}^1/_2 U_0 (1 - \cos 3\varphi), \qquad (3.9)$$

где U_0 — высота потенциального барьера (рис. 3.2). Значение U_0 возрастает при замене атомов Н в этане на более объемистые атомы и группы и уменьшается при удлинении оси вращения (ср. $H_3C—CH_3$, $H_3C—SiH_3$, $H_3Si—SiH_3$). Некоторые экспериментальные значения U_0 приведены в табл. 3.1.

Потенциальная энергия внутреннего вращения определяется слабыми взаимодействиями валентно несвязанных атомов и групп

(в этане это взаимодействие атомов H одной группы CH_3 с атомами H другой группы CH_3). Строгий квантовомеханический расчет величины U_0 затруднителен, так как она много меньше суммарной энергии химических связей в молекуле и определяется как малая разность двух больших величин — полных энергий молекулы в *цис-* и *транс*-конформациях. Барьер возникает вследствие отталкивания валентно несвязанных атомов и взаимодействия связей, примыкающих к оси вращения (эффект ориен-

Таблица 3.1. Высоты энергетических барьеров внутреннего вращения

Молекула	кДж/моль	ккал/моль	Молекула	кДж/моль	ккал/моль
$H_3C—CH_3$	12,2	2,9	$H_3C—OH$	4,6	1,1
$H_3C—CH_2CH_3$	14,3	3,4	$H_3C—OCH_3$	11,3	2,7
$H_3C—CH(CH_3)_2$	16,4	3,9	$H_3C—SH$	5,5	1,3
$H_3C—C(CH_3)_3$	18,5	4,4	$H_3C—CH=CH_2$	8,4	2,0
$H_3C—CH_2F$	13,9	3,3	$H_3C—SiH_3$	7,1	1,7
$H_3C—CH_2Cl$	15,5	3,7	$H_3Si—SiH_3$	4,2	1,0
$H_3C—CH_2Br$	15,1	3,6	$H_3C—C\equiv C—CH_3$	0	0

тации связей). И то, и другое делает более устойчивой *транс*-конформацию (принцип скрещенных связей). Межатомное отталкивание можно оценить, зная характерные зависимости энергии межмолекулярного взаимодействия от расстояний между молекулами для модельных веществ (см. с. 64). Труднее определить эффект ориентации связей. Грубую оценку можно получить, считая, что в этане из-за малого ван-дер-ваальсова радиуса атома водорода $U(\varphi)$ целиком определяется эффектом ориентации и что у производных этана этот эффект тот же. Тогда получаем для производных этана

$$U(\varphi) = {}^1/_2 U_{эт}(1 - \cos 3\varphi) + \sum_{i,j} U(r_{ij}); \qquad (3.10)$$

$U(r_{ij})$ — энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий валентно несвязанных атомов i и j, находящихся на расстоянии r_{ij} друг от друга. Ясно, что r_{ij} зависит от φ.

Если связи не полярны, то $U(r_{ij})$ слагается из энергии дисперсионных сил (с. 56) и энергии отталкивания.

Если взаимодействуют полярные молекулы или группы, обладающие дипольными моментами, то кроме дисперсионных сил действуют электростатические — ориентационные и индукционные (с. 55, 56).

Все три вида сил одинаковым образом зависят от расстояния — соответствующие энергии обратно пропорциональны r^6. Энергии ван-дер-ваальсова отталкивания еще сильнее зависят от расстояния, так как отталкивание существенно больше на малых расстояниях. Приближенно можно считать, что энергия отталкива-

ния обратно пропорциональна r^{12}. Полную энергию ван-дер-ваальсовых взаимодействий атомов, молекул или групп можно представить формулой

$$U(r) = \frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6}; \qquad (3.11)$$

$U(r)$ — *потенциал «6—12» Леннард-Джонса.* На рис. 3.3 показана форма соответствующей кривой. Энергия взаимодействия минимальна и равна $-B^2/4A$ на расстоянии $r_0 = (2A/B)^{1/6}$. Потенциал (3.11) является эмпирическим. Предложены и другие

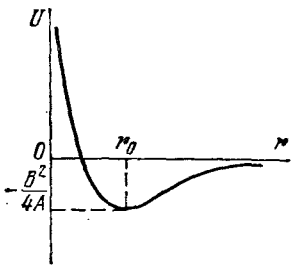


Рис. 3.3. Зависимость потенциальной энергии ван-дер-ваальсова взаимодействия от межмолекулярного расстояния

потенциалы, в частности, отталкивание можно представить экспонентой $A\exp(-ar)$. Этим вводится еще один эмпирический параметр.

В табл. 3.2 представлены константы потенциала Леннард-Джонса для некоторых пар атомов.

Таблица 3.2. **Константы потенциала Леннард-Джонса**

Атомы	$B\cdot10^6$, кДж/моль·нм^6	$A\cdot10^{12}$, кДж/моль·нм^{12}	r_0, нм	Атомы	$B\cdot10^6$, кДж/моль·нм^6	$A\cdot10^{12}$, кДж/моль·нм^{12}	r_0, нм
HH	197,4	18,9	0,24	CN	1537,2	907,2	0,32
CC	1554,0	1201,2	0,34	CH	537,6	159,6	0,29
NN	1524,6	676,2	0,31	NO	1533,0	642,6	0,31
OO	1541,4	609,0	0,30	HO	520,8	105,0	0,27
CO	1541,4	861,0	0,32	NH	525,0	113,4	0,28

В основе вычислений энергии внутреннего вращения лежит предположение о том, что внутримолекулярные невалентные взаимодействия имеют тот же характер, что и межмолекулярные. В частности, Китайгородский развил для этих целей *метод атом — атом потенциалов*, ранее разработанный им же для расчета энергий молекулярных кристаллов. В качестве эмпирических параметров используются равновесные расстояния между валентно несвязанными атомами r_0. Кроме того, учитывается, что в молекулах потенциалы не имеют сферической симметрии — так, равновесный радиус одновалентного атома зависит от угла, обра-

зуемого этим радиусом и валентной связью. Этим вводится еще один эмпирический параметр. Лучшие результаты, однако, дает учет не атом-атомных, а *связь-связевых взаимодействий.* Мы вернемся к рассмотрению конформаций молекул в следующей главе.

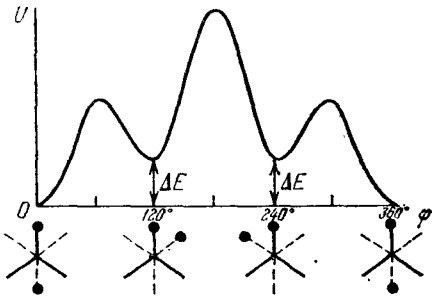
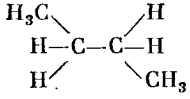


Рис 3.4. Зависимость потенциальной энергии внутреннего вращения в *н*-бутане от угла поворота

Если молекула, в отличие от этана, не имеет аксиальной симметрии, кривая $U(\varphi)$ уже не может быть описана формулой типа (3.9). Так, например, для молекулы *н*-бутана



кривая зависимости внутренней энергии от угла поворота φ вокруг центральной связи C—C имеет форму, показанную на рис. 3.4. Имеются три минимума энергии: первый наиболее глубокий (при 0 и 360°) отвечает *транс*-конформации, два других одинаковой глубины — конформациям, получаемым поворотом из *транс*-положения одной группы C_2H_5 относительно другой группы C_2H_5 на 120 и −120°. Эти конформации называются свернутыми или *гош*-конформациями.

Очевидно, что молекулы, характеризуемые несколькими неэквивалентными минимумами энергии $U(\varphi)$, существуют именно в этих состояниях, переходя из одной конформации в другую со скоростью, определяемой высотой барьера, разделяющего минимумы. Равновесные числа молекул *н*-бутана в *транс*-(N_t) и свернутых вправо и влево на 120° конформациях (N_d и N_l) легко вычисляются по закону распределения Больцмана:

$$N_t = N\frac{1}{1+2\exp(-\Delta E/RT)}, \quad N_d = N_l = N\frac{\exp(-\Delta E/RT)}{1+2\exp(-\Delta E/RT)}, \tag{3.12}$$

где ΔE — разность энергии минимумов (рис. 3.4). Очевидно, что $N_t + N_d + N_l = N$ — полное число молекул. Вещество представляет собой динамическую смесь конформаций, которые называют поразному: *поворотными изомерами, ротамерами, конформерами.* Состав термодинамически равновесной смеси определяется разностью энергий ротамеров ΔE и температурой. При $T \to \infty$ число

молекул $N_t = N_d = N_l = N/3$; при понижении T до температуры плавления вещество кристаллизуется в форме одного наиболее устойчивого ротамера и формулы (3.12) становятся неприменимыми.

При высотах барьеров порядка десяти кДж/моль время поворотной изомеризации, т. е. время превращения *одного* ротамера в другой, имеет порядок 10^{-10} с. К такой оценке приводит расчет на основе теории абсолютных скоростей реакций (см. § 6.1). Следовательно, ротамеры нельзя разделить. Их наличие и доля устанавливаются путем изучения физических и химических свойств смеси ротамеров. Пространственное строение ротамеров различно, соответственно различаются и их колебательные спектры. За время жизни ротамера происходят сотни и тысячи колебаний (с частотами порядка 10^{12}—10^{13} $с^{-1}$) — ротамер успевает «выдать» свой спектр. Действительно, существование поворотной изомерии было впервые установлено Кольраушем с помощью спектров комбинационного рассеяния. Отношение интенсивностей спектральных линий, отвечающих различным ротамерам, зависит от их содержания в смеси в соответствии с формулами (3.12). Следовательно, ΔE можно определить по температурному ходу интенсивностей спектральных линий. Так, для *н*-бутана найдено $\Delta E \approx 2{,}5$ кДж/моль.

Информацию о ротамерии получают также с помощью радиочастотной спектроскопии, ЯМР, электронографии, измерения дипольных моментов и т. д. Теоретический расчет величин ΔE проводится, естественно, теми же методами, что и расчет барьеров (с. 93). Если энергия системы зависит от нескольких углов (в случае *н*-бутана от углов

$$\varphi\left(-H_2C-CH_2-\right) \text{ и } \varphi_1 = \varphi_2\left(H_3C-CH_2-\right),$$

то вычисляется уже не кривая типа рис. 3.4, а многомерная энергетическая поверхность $U(\varphi, \varphi_1, \varphi_2, \ldots)$ — своего рода геодезическая карта. Мы познакомимся с такими поверхностями при рассмотрении конформаций белков.

Подчеркнем принципиальное различие между конформациями и *конфигурациями* молекул. Переход из *одной конформации в* другую происходит в результате внутренних поворотов вокруг единичных связей. Конфигурация при этом не меняется. Напротив, для изменения конфигурации необходимы разрывы ковалентных связей и новое их образование. Пример различных конфигураций — зеркальные антиподы хиральных молекул (см. рис. 2.10).

Изучение поворотной изомерии и изомеризации, т. е. конформаций и конформационных превращений, приобрело большое значение в органической и биоорганической химии. Главные особенности физического поведения синтетических и биологических макромолекул связаны с их конформационными свойствами.

§ 3.3. Конформационная теория макромолекул

В цепи полиэтилена (с. 59), состоящей из единичных связей С—С, внутренние повороты происходят в каждом звене цепи. Именно внутренним вращением, т. е. конформационными переходами, и определяется гибкость цепи, ответственная за высокоэластичность полимера.

Построим максимально упрощенную модель макромолекулы в виде шарнирно соединенных стержней одинаковой длины b (рис. 3.5). Каждый стержень свободно поворачивается по отношению к соседним. Тем самым набор конформаций, возникающих при поворотах вокруг данного атома цепи — шарнира, непрерывен в интервале углов от 0 до 4π и энергия при поворотах не меняется. Цепь можно охарактеризовать вектором $\mathbf{h}$, проведенным от первого атома цепи к последнему (рис. 3.5). Очевидно, что среднее по всем конформациям значение вектора $\mathbf{h}$ равно нулю: $\overline{\mathbf{h}} = 0$, так как при тепловом движении все его направления равновероятны. Нужно установить, как при этом распределены вероятности реализации тех или иных численных значений $h \equiv |\mathbf{h}|$, которые могут меняться от нуля до максимальной длины вытянутой цепи Zb (Z — число звеньев, b — длина звена). Решение этой задачи аналогично решению задачи теории броуновского движения — нахождению вероятности перемещения частицы на расстояние h в результате Z шагов, каждый из которых имеет длину b и произвольное направление. Распределение вероятностей оказывается гауссовым — вероятность того, что расстояние между концами цепи лежит в интервале от h до $h + dh$, равна

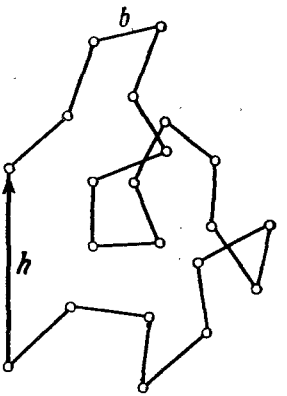


Рис. 3.5. Схема свободно сочлененной цепи

$$W(h)\,dh = \left(\frac{3}{2\pi Z b^2}\right)^{3/2} 4\pi h^2 \exp\left(-\frac{3h^2}{2Zb^2}\right) dh. \qquad (3.13)$$

Если закрепить один конец цепи в точке 0, а другой расположить в элементе объема на расстоянии h от точки 0, то число конфигураций цепи будет пропорционально элементу объема и плотности вероятности $w(h)$ этого элемента. Имеем

$$w(h) = \left(\frac{3}{2\pi Z b^2}\right)^{3/2} \exp\left(-\frac{3h^2}{2Zb^2}\right). \qquad (3.14)$$

Средний квадрат длины цепи равен

$$\overline{h^2} \approx \int_0^\infty h^2 w(h)\,dh = Zb^2. \qquad (3.15)$$

т. е. цепь сильно скручена. Формула (3.15) справедлива при $Z \gg 1$, когда верхний предел Zb может быть заменен на бесконечность.

Таким образом, тепловое движение свертывает макромолекулу в клубок. Вероятность такого состояния много больше, чем вытянутого, так как вытянутая конформация цепи может осуществляться одним способом, а свернутая — множеством способов. Клубкообразная форма макромолекул в растворе доказана прямыми опытами (§ 3.6).

Энтропийная природа высокоэластичности каучука непосредственно следует из сказанного. В нерастянутом состоянии цепи свернуты в клубки, чему соответствует максимальная энтропия. При растяжении клубка энтропия уменьшается. Энтропия растянутой цепи согласно (3.14) равна (κ — постоянная Больцмана)

$$S = \kappa \ln w(h) = C - \frac{3\kappa h^2}{2Zb^2} \qquad (3.16)$$

и; согласно (3.8), упругая сила, возникающая при растяжении цепи, равна

$$f = -T\left(\frac{\partial S}{\partial h}\right)_T = \frac{3\kappa T}{Zb^2} h. \qquad (3.17)$$

Закон Гука справедлив, модуль упругости пропорционален абсолютной температуре. Мы изложили кинетическую теорию упругости каучука, предложенную Куном.

В реальных макромолекулах валентные углы между связями фиксированы и повороты не свободны. Зададим положение двух соседних звеньев цепи полиэтилена (рис. 3.6). Третье звено может занимать различные положения на поверхности конуса с раствором 2ϑ ($\pi - \vartheta$ — валентный угол между связями С—С, близкий к тетраэдрическому 109°28′). Этим различным положениям, характеризуемым углом поворота φ вокруг второй связи С—С, отвечают разные энергии $U(\varphi)$. Положение четвертой связи по отношению к первым двум менее определенно, так как она лежит на конусе, описанном вокруг каждого из положений третьей связи, и т. д. Достаточно удаленная связь располагается по отношению к первой связи практически произвольным образом. Поэтому длинная цепь свертывается в клубок. Макромолекулу можно мысленно разбить на сегменты, положения которых уже не коррелированы друг с другом. Формулы (3.13)—(3.17) сохраняются, но Z и b означают число и длину свободно сочлененных сегментов, а не реальных звеньев.

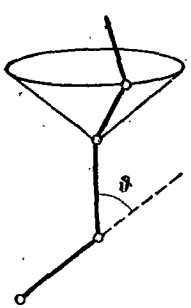


Рис. 3.6 Цепь с фиксированными валентными углами

Можно, однако, построить молекулярную теорию цепи, выразив длину цепи через число реальных звеньев N, длину звена l

и угол ϑ. Вектор $\mathbf{h}$ есть сумма векторов звеньев

$$\mathbf{h} = \sum_{i=1}^{N} \mathbf{l}_i. \tag{3.18}$$

Следовательно,

$$\overline{h^2} = \sum_{i=1}^{N}\sum_{j=1}^{N} \overline{\mathbf{l}_i \mathbf{l}_j} = \sum_{i=1}^{N} l_i^2 + 2\sum_{i=2}^{N}\sum_{j=1}^{i-1} \overline{\mathbf{l}_i \mathbf{l}_j}. \tag{3.19}$$

В реальной цепи средние значения скалярных произведений $\mathbf{l}_i\mathbf{l}_j$ зависят от углов ϑ и φ. Для цепи с симметричными привесками типа полиэтилена строгий расчет дает *формулу Ока* (при $N \gg 1$)

$$\overline{h^2} = Nl^2 \frac{1+\cos\vartheta}{1-\cos\vartheta}\frac{1+\eta}{1-\eta}, \tag{3.20}$$

где η — средний косинус угла φ внутреннего вращения

$$\eta = \overline{\cos\varphi} = \frac{\int_0^{2\pi} \cos\varphi \cdot \exp\left(-U(\varphi)/\kappa T\right) d\varphi}{\int_0^{2\pi} \exp\left(-U(\varphi)/\kappa T\right) d\varphi}. \tag{3.21}$$

Величина $\overline{h^2}$, вычисленная по (3.20), больше, чем для свободносочлененной цепи (Nl^2), так как корреляция, определяемая отсутствием свободы вращения и валентными углами, удлиняет цепь. Величина $\overline{h^2}$ есть мера *термодинамической гибкости* — чем меньше $\overline{h^2}$ при заданных N и l, тем больше скручена цепь, тем больше ее гибкость. Вычисление $\overline{h^2}$ сводится к вычислению η, что требует знания потенциальной энергии $U(\varphi)$. Эту трудность, однако, можно обойти.

Теория размеров, формы, электрических и оптических свойств макромолекул в растворе должна исходить из физического

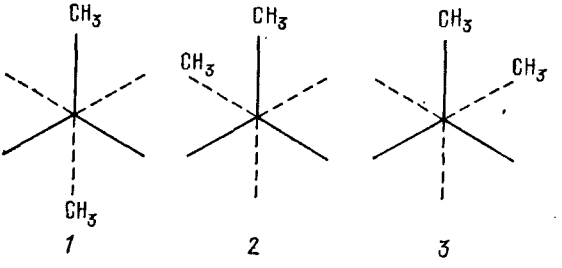


Рис. 3.7. Ротамеры *н*-бутана

механизма их гибкости. Этот механизм раскрывается *поворотно-изомерной*, или *конформационной*, *теорией* (Волькенштейн, 1951—1958). Как мы видели, лишенные аксиальной симметрии малые молекулы образуют вследствие поворотов вокруг единичных связей различные поворотные изомеры (ротамеры). На рис. 3.7 пока-

заны ротамеры *н*-бутана (ср. рис. 3.4), на рис. 3.8 — подобные им ротамеры полиэтилена, получающиеся в результате поворота вокруг любой связи С—С в цепи. Различие состоит лишь в том, что в полиэтилене вместо CH_3-групп фигурируют группы CH_2, присоединенные к продолжающейся цепи, что изображено знаком $\sim$. Отсюда следует, что можно рассматривать макромолекулу как

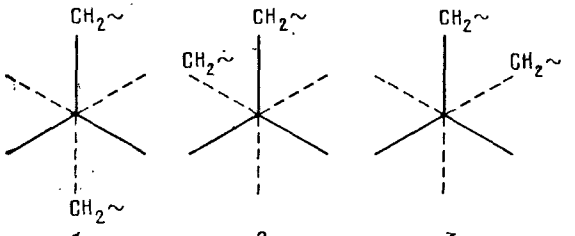


Рис. 3.8. Ротамеры полиэтилена

равновесную смесь поворотных изомеров, а внутреннее вращение в цепи — как поворотную изомеризацию, т. е. как переходы из одной конформации в другую. Это значит, что вместо непрерывной кривой $U(\varphi)$ достаточно рассматривать состояния цепи, отвечающие ротамерам с дискретными, фиксированными значениями φ. Интегрирование в (3.21) заменяется суммированием по ротамерам. Так, для полиэтилена, имеющего три ротамера *1*, *2*, *3* (рис. 3.8),

$$\eta = \frac{\cos\varphi_1 \cdot \exp\left(-\frac{E_1}{\kappa T}\right) + \cos\varphi_2 \cdot \exp\left(-\frac{E_2}{\kappa T}\right) + \cos\varphi_3 \cdot \exp\left(-\frac{E_3}{\kappa T}\right)}{\exp\left(-\frac{E_1}{\kappa T}\right) + \exp\left(-\frac{E_2}{\kappa T}\right) + \exp\left(-\frac{E_3}{\kappa T}\right)}. \quad (3.22)$$

Для полиэтилена $E_2 - E_1 = E_3 - E_1 = \Delta E$, $\varphi_1 = 0°$, $\varphi_2 = 120°$, $\varphi_3 = -120°$ (ср. рис. 3.4) и

$$\eta = \frac{1 - \exp(-\Delta E/\kappa T)}{1 + 2\exp(-\Delta E/\kappa T)}. \quad (3.23)$$

При $\Delta E = 2500$ Дж/моль (с. 66) и $T = 273$ К величина $\eta = 0{,}37$. Находим по формуле Ока (3.20) при $\cos\vartheta = \cos(\pi - 109°28') = -1/3$ величину $\overline{h^2} = 1{,}1Nl^2$. Термодинамическая гибкость тем больше, чем меньше η, т. е. чем меньше ΔE.

Конечно, в действительности происходят флуктуации — крутильные колебания около значений φ, отвечающих поворотным изомерам. Однако их можно не учитывать, так как эти колебания, будучи случайными, в среднем компенсируют друг друга и не влияют на усредненные свойства цепей.

Поворотно-изомерная теория хорошо обоснована для тех случаев, когда минимумы энергии $U(\varphi)$ разделены барьерами, существенно превышающими κT. Если барьеры малы, поворотно-

изомерная теория сохраняет значение приближенного математического метода, заменяющего интегрирование суммированием.

Реальное существование ротамеров у макромолекул установлено рядом методов, прежде всего методом инфракрасной спектроскопии, при изучении термомеханических свойств и растяжения полимеров. Поворотно-изомерная теория лежит в основе статистической физики макромолекул. Она позволяет вычислять не только размеры макромолекулярных клубков, но и их дипольные моменты и поляризуемости, ответственные за электрические и оптические свойства.

Расчет гибкости основывается на химическом строении макромолекул. Мы все время говорили о полиэтилене. Однако многие макромолекулы содержат в своих звеньях массивные привески, например, полистирол $(-CH_2-CHR-)_n$, где R есть C_6H_5. В этих случаях конформации определяются преимущественно взаимодействиями привесков. Сведения о конформациях цепи можно получить методом рентгеноструктурного анализа — если полимер кристаллизуется. При кристаллизации фиксируются определенные ротамеры для всех звеньев цепи и возникает дальний порядок: зная положение атомов в данном мономерном звене, мы знаем их для сколь угодно удаленных звеньев, так как расположение атомов строго периодично. Вместе с тем, в кристалле имеется, конечно, и ближний порядок — определенное расположение соседних звеньев. Кристаллический ближний порядок сохраняется при плавлении и растворении полимера, так как кристаллическая структура полимера отвечает минимуму потенциальной энергии. Можно предположить, что ближний одномерный порядок в свободной макромолекуле, образующей статистический клубок, аналогичен дальнему одномерному порядку в кристалле. Эта идея получила подтверждение в расчетах конформаций и в результатах экспериментальных исследований.

Повороты в соседних звеньях не независимы друг от друга — имеется корреляция, удлиняющая цепь. У полиэтилена устойчивы конформации соседних звеньев (0°, 0°), т. е. (t, t); (0°, 120°) и (0°, −120°) (t, s); (120°, 0°), (−120°, 0°) (s, t); (120°, 120°) и (−120°, −120°) (s, s). Конформации (120°, −120°) и (−120°, 120°), т. е. (s^+, s^-) и (s^-, s^+), энергетически невыгодны. Средняя квадратичная длина цепи, вычисленная с учетом корреляции, оказывается равной не $1{,}1\,Nl^2$, а $1{,}6\,Nl^2$.

Для несимметричной цепи $(-CH_2-CHR-)_n$ повороты по часовой стрелке и против нее не эквивалентны и формула (3.20) несправедлива. В этом случае в выражение для $\overline{h^2}$ наряду с $\cos\varphi$ будет входить и $\sin\varphi$; в симметричном случае $\sin\varphi = 0$.

Поворотно-изомерная теория дает количественное истолкование физических свойств макромолекул в растворе в хорошем согласии с опытом. Она раскрывает физический механизм растяжения каучука, состоящий в поворотной изомеризации, в конформационных превращениях. Сказанное можно пояснить одномерной моделью макромолекулы. Представим каждое звено стрелкой дли-

ны l, которая направлена вправо или влево. Одному ротамеру (обозначаемому t), отвечают две соседние стрелки, смотрящие в одну сторону, другому (s) — смотрящие в разные стороны. Общая длина цепи выражается векторной суммой длин всех стрелок. На рис. 3.9, *а* изображена цепь, состоящая из 10 звеньев. Из них 5 смотрят вправо, 5 — влево, следовательно, общая длина цепи $h=0$. В цепи пять t- и пять s-ротамеров (чтобы общее число

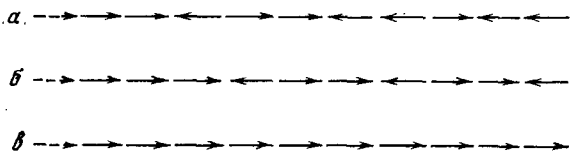


Рис. 3.9. Одномерная модель, иллюстрирующая растяжение цепи

ротамеров равнялось числу звеньев, т. е. 10, добавлено еще «нулевое» звено, смотрящее вправо,— оно показано пунктиром). Будем растягивать цепь силой, поворачивающей стрелки вправо. На рис. 3.9, *б* показано одно из вытянутых состояний цепи с длиной $h=(7-3)l=4l$. При этом числа ротамеров остались прежними — по пяти. Цепь удлинилась до $4l$ в результате перераспределения ротамеров без изменения их относительного содержания. Произошел переход $ttssts tsst \rightarrow ttts stssts$, не сопровождаемый изменением энергии. Однако путем перераспределения ротамеров без изменения их количеств нельзя достичь полного растяжения цепи. Полностью растянутая цепь (рис. 3.9, *в*) состоит из 10 t-ротамеров. В этом случае превращение сопровождается изменением и энтропии, и энергии: $10E_t \neq 5E_t + 5E_s$. Действительно, независимость внутренней энергии каучука от растяжения (формула (3.6)) выполняется не вполне строго. Наряду с энтропийным имеется некоторый энергетический вклад в высокоэластичность, поскольку разность энергий ротамеров ΔE отлична от нуля. Тем самым $(\partial E/\partial h)_T \neq 0$. Это подтверждается опытом. Исследования термомеханических свойств каучуков не только подтвердили наличие небольшой энергетической упругости, но позволили найти из опыта значения ΔE в хорошем согласии с теоретическими. Прямое исследование растяжения полимеров методом инфракрасной спектроскопии показало, что при растяжении действительно изменяется относительное содержание ротамеров.

Если гибкость макромолекулы мала (т. е. велики значения ΔE), то может реализоваться механизм скручивания цепи в клубок, отличный от поворотно-изомерного. Происходит не ротамеризация, но крутильные колебания около единственного значения φ. Возникает весьма рыхлый клубок. К таким жестким макромолекулам относятся двойные спирали ДНК. Жесткую цепь, в которой происходят крутильные колебания, можно рассматривать как упругий стержень (см. § 3.5).

Мы все время говорим о термодинамической, равновесной гибкости макромолекул, определяемой величиной ΔE. *Кинетическая гибкость*, характеризующая поведение макромолекулы во времени, т. е. скорость конформационного превращения, зависит главным образом не от ΔE, а от высоты энергетического барьера, разделяющего различающиеся конформации. И термодинамическая, и кинетическая гибкости варьируют в широких пределах. Макромолекулы, построенные из сопряженных π-связей или из сопряженных ароматических колец, являются жесткими — они лишены конформационной подвижности. В отличие от макромолекул с σ-связями (полиэтилен, каучук), сопряженные цепи являются своего рода π-электронными полупроводниками. С этим связано поглощение света в длинноволновой области — соответствующие полимеры практически черны. Гибкость и полупроводниковые свойства макромолекул не совместимы.

§ 3.4. Макромолекула как кооперативная система

Как уже сказано и как это видно из рис. 3.9, состояние (конформация) данного звена макромолекулы зависит от состояний соседних звеньев. Система, состояния элементов которой зависят друг от друга, называется кооперативной. Впервые понятие о кооперативности было введено Фаулером при изучении фазовых переходов. Эти важнейшие явления нельзя понять без учета взаимодействия элементов системы. Так, переход газ — жидкость есть кооперативный переход. Уравнение, связывающее газообразное и жидкое состояния,— уравнение Ван-дер-Ваальса

$$\left(p + \frac{a}{V^2}\right)(V - b) = RT, \tag{3.24}$$

где a, b, R — константы.

Сожмем газ при температуре ниже критической. Уменьшение объема V увеличивает взаимное притяжение молекул a/V^2, что в свою очередь вызывает уменьшение объема, и т. д. Кооперация большого числа частиц приводит к резкому переходу, идущему по принципу «все или ничего».

В статистической механике развиты методы для расчета свойств кооперативных систем — вычисления статистической суммы, с помощью которой находятся все термодинамические характеристики системы. Учет взаимосвязи конформаций в одномерной кооперативной системе, в макромолекуле, приводит к тому, что выражение потенциальной энергии содержит члены, зависящие от конформаций по крайней мере двух соседних звеньев:

$$U(\Omega_1, \Omega_2, \ldots, \Omega_N) = \sum_{i=1}^{N} U(\Omega_{i-1}, \Omega_i), \tag{3.25}$$

где Ω_i — конформация i-го звена, представленная соответствующими углами поворота, N — число звеньев.

Приводим расчет, основанный на *одномерной модели Изинга* и выполняемый с помощью матричного метода, предложенного Крамерсом и Ваннье.

Конформационная статистическая сумма для макромолекулы в отсутствие внешних сил имеет вид

$$Z = \sum_{\Omega_1} \sum_{\Omega_2} \dots \sum_{\Omega_N} \exp\left(-\frac{U(\Omega_1, \Omega_2, \dots, \Omega_N)}{\kappa T}\right). \tag{3.26}$$

Суммирование производится по r ротамерам каждого звена. Если справедливо выражение (3.25), то

$$Z = \sum_{\Omega_1} \sum_{\Omega_2} \dots \sum_{\Omega_N} \prod_{i=1}^{N} g(\Omega_{i-1}, \Omega_i), \tag{3.27}$$

где

$$g(\Omega_{i-1}, \Omega_i) = \exp\left(-\frac{U(\Omega_{i-1}, \Omega_i)}{\kappa T}\right). \tag{3.28}$$

Считая, что цепь состоит из повторяющихся одинаковых единиц, можно рассматривать величины $g(\Omega_{i-1}, \Omega_i)$ как элементы матрицы

$$\mathbf{G} = \begin{pmatrix} g(\Omega^{(1)}, \Omega^{(1)}) & \dots & g(\Omega^{(1)}, \Omega^{(r)}) \\ \vdots & & \vdots \\ g(\Omega^{(r)}, \Omega^{(1)}) & \dots & g(\Omega^{(r)}, \Omega^{(r)}) \end{pmatrix}. \tag{3.29}$$

Обозначим

$$g\left(\Omega_{i-1}^{(m)}, \Omega_i^{(n)}\right) = G_{\Omega_{i-1}^{(m)}, \Omega_i^{(n)}}. \tag{3.30}$$

Статистическая сумма (3.27) переписывается в виде

$$Z = \sum_{\Omega_1} \sum_{\Omega_2} \dots \sum_{\Omega_N} G_{\Omega_0\Omega_1} G_{\Omega_1\Omega_2} \dots G_{\Omega_{N-1}\Omega_N} \tag{3.31}$$

и по правилу перемножения матриц находим

$$Z = \sum_{\Omega_N} \mathbf{G}^N_{\Omega_0\Omega_N}. \tag{3.32}$$

Вводя условие цикличности $\Omega_0 = \Omega_N$ (при $N \gg 1$ это условие не играет роли), получаем Z в виде следа $\mathrm{Sp}\,\mathbf{G}^N$, т. е. суммы диагональных членов матрицы $\mathbf{G}$, взятой в степени N:

$$Z = \mathrm{Sp}\,\mathbf{G}^N = \lambda_1^N + \lambda_2^N + \dots + \lambda_r^N, \tag{3.33}$$

где λ_n — собственные числа матрицы $\mathbf{G}$. Все элементы матрицы положительны. Отсюда следует, что она имеет максимальное собственное число λ_1, вещественное, положительное и невырожденное (теорема Фробениуса). При $N \gg 1$

$$Z \approx \lambda_1^N. \tag{3.34}$$

Таким образом, вычисление ротамерной статистической суммы сводится к нахождению максимального корня матрицы λ_1. Зная Z, мы можем вычислить равновесные характеристики макромолекул. В частности, этим методом находится средняя квадратичная длина клубка $\overline{h^2}$ (см. формулу (3.20) и формулы, учитывающие корреляцию ротамеров).

Рассмотрим с помощью этого метода растяжение одномерной кооперативной модели рис. 3.9 внешней силой f. Пусть энергия t-ротамера, т. е. энергия двух соседних параллельных звеньев, равна $-E$, энергия s-ротамера, т. е. двух соседних антипараллельных звеньев, равна E. Следовательно, разность энергий ротамеров равна

$$\Delta E = 2E. \tag{3.35}$$

Запишем это условие в форме

$$E_{ij} = \begin{cases} -E\sigma_i\sigma_j, & \text{если } i = j+1, \\ 0, & \text{если } i \neq j+1. \end{cases} \tag{3.36}$$

Здесь $\sigma_i = 1$, если звено (стрелка) смотрит вправо, и $\sigma_i = -1$, — если влево; i и j — номера звеньев. Энергия $E_{ij} = 0$, если звенья расположены не рядом — корреляция распространяется только на соседние стрелки. Если действует внешняя сила f, ориентирующая стрелки вправо, то каждое звено длиной l приобретает дополнительную энергию

$$E_f = -lf\cos\varphi = -lf\sigma_i, \tag{3.37}$$

где φ — угол между направлением звена и внешней силой. Так как каждая стрелка может находиться лишь в двух положениях, то матрица G имеет порядок $\lambda = 2$. Согласно (3.28) находим

$$g(\sigma_j, \sigma_{j+1}) = \exp\left(\frac{E}{\kappa T}\sigma_j\sigma_{j+1} + \frac{lf}{\kappa T}\sigma_j\right), \tag{3.38}$$

и матрица G получается при подстановке значений σ_j и σ_{j+1}, равных $+1$ и -1:

$$\mathbf{G} = \begin{pmatrix} g(1, 1) & g(1, -1) \\ g(-1, 1) & g(-1, -1) \end{pmatrix}. \tag{3.39}$$

Обозначив $a = E/\kappa T$, $b = lf/\kappa T$, имеем

$$\mathbf{G} = \begin{pmatrix} \exp(a+b) & \exp(-a+b) \\ \exp(-a-b) & \exp(a-b) \end{pmatrix}. \tag{3.40}$$

Собственные числа находим из уравнения

$$\begin{vmatrix} \exp(a+b)-\lambda & \exp(-a+b) \\ \exp(-a-b) & \exp(a-b)-\lambda \end{vmatrix} = 0. \tag{3.41}$$

Они равны

$$\lambda_{1,2} = e^a \operatorname{ch} b \pm (e^{2a}\operatorname{sh}^2 b + e^{-2a})^{1/2}. \tag{3.42}$$

Так как $\lambda_1 > \lambda_2$, то, согласно (3.34),

$$Z \approx \lambda_1^N = [e^a \operatorname{ch} b + (e^{2a}\operatorname{sh}^2 b + e^{-2a})^{1/2}]^N. \tag{3.43}$$

Мы получили простое аналитическое выражение для статистической суммы. Пользуясь им, вычислим среднюю длину цепи:

$$\bar{h} = \kappa T \frac{\partial \ln Z}{\partial f} = N\kappa T \frac{\partial \ln \lambda_1}{\partial f} = Nl \frac{\operatorname{sh} b}{(\operatorname{sh}^2 b + e^{-4a})^{1/2}}. \tag{3.44}$$

Мерой кооперативности здесь является величина a, т. е. $\Delta E/\kappa T$. В отсутствие кооперативности, т. е. при $a = 0$,

$$\bar{h} = Nl \operatorname{th} b = Nl \operatorname{th} \frac{lf}{\kappa T}. \tag{3.45}$$

При свободной ориентации стрелок длина цепи тем больше, чем больше сила и чем ниже температура. При малых силах, т. е. при $fl \ll \kappa T$

$$\bar{h} \approx Nl^2 f/\kappa T \tag{3.46}$$

или

$$f \approx \frac{\kappa T}{Nl^2}\bar{h}, \tag{3.47}$$

т. е. длина цепи пропорциональна растягивающей силе (закон Гука), причем модуль упругости пропорционален абсолютной температуре. Если,

напротив, $a \gg 1$, т. е. $\Delta E \gg \kappa T$, то можно пренебречь в (3.44) величиной e^{-4a} и $\bar{h} = Nl$ независимо от силы. Цепь жесткая, и потому она вытянута. Тот же результат получается при больших силах, т. е. при $fl \gg \kappa T$. Здесь также $\mathrm{sh}^2 b \gg e^{-4a}$ — большая сила полностью растягивает цепь.

Средняя квадратичная длина ротамерной одномерной цепи, в отсутствие внешней силы, вычисляется непосредственно по формуле (ср. (3.19)):

$$\overline{h^2} = Nl^2 + 2\sum_{i=2}^{N}\sum_{j=1}^{i-1}\overline{(l_i l_j)} = Nl^2\frac{1+\eta}{1-\eta} + 2l^2\frac{\eta(\eta^N - 1)}{(1-\eta)^2}, \qquad (3.48)$$

где η — средний косинус угла между соседними стрелками. В рассматриваемом случае

$$\eta = \frac{\cos 0^\circ \cdot \exp(E/\kappa T) + \cos 180^\circ \cdot \exp(-E/\kappa T)}{\exp(E/\kappa T) + \exp(-E/\kappa T)} = \mathrm{th}\frac{E}{\kappa T} \qquad (3.49)$$

и при $N \gg 1$

$$\overline{h^2} = Nl^2 \exp(2E/\kappa T).$$

Корреляция, определяемая выгодой параллельного расположения стрелок, удлиняет цепь.

Конформационные превращения макромолекул как при плавлении кристаллического полимера, так и при растяжении цепи кооперативны.

§ 3.5. Клубок и глобула

Макромолекулы и системы, состоящие из них, характеризуются взаимодействиями, резко разнящимися по энергии. Сильные, ковалентные связи с энергиями порядка 400 кДж/моль связей определяют последовательность звеньев, которая не меняется благодаря тепловым флуктуациям. Остальные силы, ответственные за конформационные свойства цепи и взаимодействия ее звеньев друг с другом и со звеньями соседних молекул, имеют много меньшие энергии и существенным образом зависят от температуры. Таким образом, цепь находится в состоянии парциального равновесия с фиксированной линейной памятью (Лифшиц). Этим определяются важные особенности макромолекул.

Полимерный клубок, возникающий вследствие тепловых флуктуаций — поворотов вокруг единичных связей, является рыхлым образованием. На рис. 3.10 показана полученная в модельном эксперименте на ЭВМ типичная конформация клубка из 626 звеньев (Балабаев). Клубок как флуктуирующая система характеризуется корреляцией плотности, т. е. связью изменения плотности в одной области пространства, занятой клубком, с изменением плотности в другой его области. Оказывается, что радиус корреляции того же порядка, что и размер клубка. Причиной этого является именно линейная память цепи. Тем самым плотность клубка не является его термодинамической характеристикой, она не имеет достоверного постоянного значения. Клубок флуктуирует и его флуктуации макроскопичны. Имеет смысл лишь средняя плотность клубка.

Гибкость макромолекулы выражается в размерах клубка — чем больше эти размеры при том же числе звеньев, тем более жесткой является макромолекула. Существенной характеристикой гибкости служит *персистентная длина цепи* d.

Допустим, что цепь состоит из $N+1$ звеньев длиною l каждое, образующих друг с другом углы $\varphi_1, \varphi_2, \ldots, \varphi_N$. Косинус угла между i-м и $i+j$-м звеньями равен

$$\cos\varphi_{i,\,i+j} = \mathbf{l}_i\mathbf{l}_{i+j}/l^2 = (\overline{\cos\varphi})^j, \tag{3.50}$$

где $\overline{\cos\varphi}$ — среднее значение $\cos\varphi$. При малых φ

$$\cos\varphi_{i,\,i+j} \approx (1-\overline{\varphi^2}/2)^j \approx$$

$$\approx \exp(-j\overline{\varphi^2}/2), \tag{3.51}$$

$$\cos\varphi_{1,\,N+1} \approx \exp(-N\overline{\varphi^2}/2) =$$

$$= \exp(-L/d), \tag{3.52}$$

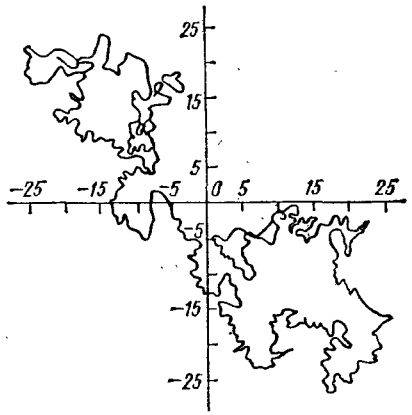


Рис. 3.10. Конформация клубка

где L — контурная длина цепи. Персистентная длина d, равная

$$d = 2l/\overline{\varphi^2}, \tag{3.53}$$

характеризует потерю корреляции между звеньями при движении вдоль цепи. Смысл d следующий: участок цепи, более короткий чем d, можно рассматривать как твердый стержень. Сегменты с длинами d свободно сочленены. Теория выражает значение средней квадратичной длины цепи через L и d:

$$\overline{h^2} = 2d^2(L/d - 1 + e^{-L/d}). \tag{3.54}$$

При $L \ll d$ получим $\overline{h^2} \approx L^2$ — цепь вытянута, при $L \gg d$ имеем $\overline{h^2} \approx 2Ld$ — она свернута в клубок со статистическим сегментом длиною $2d$, так как $L = 2nd$ (n — число сегментов) и $\overline{h^2} \approx 4nd^2$. Даже очень жесткая цепь сворачивается в клубок, если она достаточно длинна. Далекие друг от друга по цепи звенья могут сближаться в клубке. При этом возникают *объемные эффекты* (Флори). Взаимодействия звеньев в клубке сходны со взаимодействиями молекул в реальном газе: сильное отталкивание на малых расстояниях и тем самым невозможность нахождения двух мономеров в одном и том же месте и слабое притяжение на больших расстояниях. Приведенные расчеты размеров клубка этих эффектов не учитывают. Тем не менее эти расчеты можно сравнивать с опытом в так называемой θ-*точке*. θ — температура, при которой в данном растворителе силы притяжения компенсируются силами отталкивания и объемные эффекты отсутствуют. θ-точка

подобна точке Бойля реального газа. При $T > \theta$ доминирует отталкивание (хороший растворитель), при $T < \theta$ — притяжение (плохой растворитель). Клубок раздувается или сжимается. Теория Флори усовершенствована Хохловым, рассматривавшим клубок как облако не мономеров, а квазимономеров, характеризующих коллективные свойства всех мономеров цепи.

Если между звеньями цепи реализуется сильное притяжение при $T < \theta$ или на клубок действует внешнее сжимающее поле, то он «схлопывается» в компактную структуру — в *глобулу*. Этот процесс до некоторой степени сходен с конденсацией газа в жидкость.

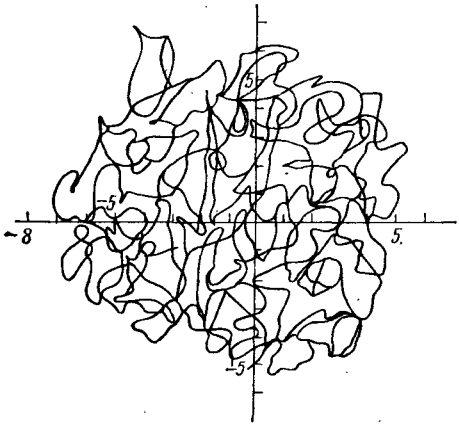


Рис. 3.11. Конформация глобулы

В отличие от клубка, в глобуле макромолекула имеет термодинамически достоверную структуру. В глобуле флуктуации локальной концентрации звеньев малы по сравнению с самой концентрацией, а радиус корреляции флуктуаций концентрации много меньше размеров макромолекулы (Лифшиц). На рис. 3.11 показана типичная глобулярная конформация свободно сочлененной цепи, состоящей из 626 звеньев с длиной звена 1. Рис. 3.11 следует сравнить с рис. 3.10.

Теория перехода клубок — глобула развита Лифшицем, Гросбергом и Хохловым. Этот переход и состояние глобулы зависят от свойств цепи. Если цепь длинная и ее гибкость мала, т. е. $\rho^3 \gg r^3$, где ρ^2 — среднее квадратичное расстояние между мономерами, соседствующими в клубке, а r — величина порядка радиуса взаимодействия между звеньями, то при $T < \theta$ переход подобен фазовому переходу первого рода со скачком плотности. Если цепь гибкая, т. е. $\rho^3 \approx r^3$, получается плавный переход второго рода с постепенным разбуханием глобулы до размеров клубка. При $\rho^3 \gg r^3$ сама глобула является двухфазной системой, состоящей из плотного ядра и флуктуирующей «опушки», плотность которой постепенно убывает до нуля. Ядро глобулы сходно с кристаллом, а не с жидкостью. При достаточно низкой температуре короткая цепь образует глобулу без «опушки».

Большинство белков в нативном состоянии глобулярно. Излагаемая здесь теория существенна для понимания структуры и свойств белков и, в частности, природы их денатурации (см. гл. 4). Гросберг и Шахнович исследовали особенности поведения сополимеров — макромолекул, состоящих из двух и большего числа различных звеньев.

§ 3.6. Методы исследования макромолекул

При любом химическом строении макромолекулы характеризуются определенной молекулярной массой (м. м.) или распределением молекулярных масс и, будучи клубками или глобулами,— размерами и формой. Остановимся на способах экспериментального определения этих характеристик.

Среди методов определения м. м. в физике полимеров имеют значение *осмометрия*, *вискозиметрия* и *седиментация в центрифуге*. Последний метод особенно широко применяется для изучения биополимеров.

Осмометрия основана на измерении осмотического давления $p_{осм}$ раствора полимера. Согласно закону Вант-Гоффа

$$p_{осм}/c = RT/M, \tag{3.55}$$

где c — концентрация раствора (в г/см^3), M — м. м. (для полидисперсных полимеров M — среднечисленная м. м.). Уравнение (3.55) справедливо для идеальных растворов. Для неидеальных растворов (растворы полимеров всегда неидеальны)

$$p_{осм} = \frac{RT}{M}c + Bc^2 + Cc^3 \ldots, \tag{3.56}$$

где B, C и т. д.— второй, третий и т. д. *вириальные коэффициенты*. Для разбавленных растворов можно препебречь третьим и последующими членами. График зависимости $p_{осм}/c$ от c линеен и позволяет найти M и B.

Характеристическая вязкость раствора полимера

$$[\eta] = \lim_{c \to 0} \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 c}, \tag{3.57}$$

где η — вязкость раствора, η_0 — вязкость чистого растворителя. Величина $[\eta]$ зависит от M. Оказывается, что для раствора полимерных клубков

$$[\eta] = AM^a, \tag{3.58}$$

причем $0{,}5 \leqslant a \leqslant 1{,}0$ в зависимости от проницаемости клубка для растворителя. Для полностью проницаемого клубка $a = 1{,}0$, для непроницаемого $a = 0{,}5$. Для жестких сфер $a = 0$, для длинных жестких стержней $a = 1{,}7$. Формулой (3.58) можно воспользоваться для нахождения м. м., если константы A и a определены из независимых данных.

Седиментационный метод состоит в осаждении макромолекул под действием центробежной силы в ультрацентрифуге, ротор которой вращается со скоростью до 10^4—10^5 об/мин. Центробежное ускорение много больше ускорения свободного падения g — в современных ультрацентрифугах оно доходит до $350\,000\,g$ (70 000 об/мин). Кювета с раствором полимера, представляющая собой цилиндр с прозрачными окнами из кристаллического квар-

ца, помещается в ротор — наблюдение ведется оптическими методами.

Если скорость седиментации значительно превосходит скорость диффузии макромолекул, то они осаждаются. В кювете образуются две области — чистый растворитель и раствор полимера. Между ними находится переходная зона, в которой концентрация растворенного полимера c меняется от нулевого до некоторого максимального значения. По мере седиментации эта зона и ее граница перемещаются. Измеряется скорость движения границы по направлению к дну кюветы, т. е. от оси вращения ротора.

На макромолекулу действует центробежная сила $V_м\rho_м\omega^2 x$, где $V_м$ — объем макромолекулы, $\rho_м$ — ее плотность, ω — угловая скорость вращения ротора, x — расстояние от оси вращения. Но в растворе на макромолекулу действует архимедова сила, и эффективная центробежная сила равна $V_м(\rho_м - \rho_0)\omega^2 x$, где ρ_0 — плотность растворителя. Эта сила уравновешивается силой трения при поступательном перемещении $\varkappa\, dx/dt$ ($\varkappa$ — коэффициент трения). В расчете на 1 моль получаем

$$N_A V_м \rho_м \left(1 - \bar{V}_м \rho_0\right) \omega^2 x = \varkappa \frac{dx}{dt}, \tag{3.59}$$

где N_A — постоянная Авогадро, $\bar{V}_м = \rho_м^{-1}$ — удельный парциальный объем макромолекулы. Но, с другой стороны,

$$N_A V_м \rho_м = M. \tag{3.60}$$

Для разбавленных растворов $\varkappa$ выражается через коэффициент диффузии D по формуле Эйнштейна

$$\varkappa = RT/D. \tag{3.61}$$

Из (3.59) — (3.61) следует формула Сведберга

$$M = \frac{RTs}{\left(1 - \bar{V}_м \rho_0\right) D}, \tag{3.62}$$

где s — *коэффициент седиментации*:

$$s = \frac{1}{\omega^2 x}\frac{dx}{dt} \equiv \frac{1}{\omega^2}\frac{d\ln x}{dt}. \tag{3.63}$$

Размерность s — секунда, обычно коэффициент седиментации измеряется в сведбергах (S), $1S = 10^{-13}$ с.

Последовательные во времени положения седиментирующей границы фотографируются в ультрафиолетовом свете. Измерив s, D, $\rho_м$ и ρ_0, можно определить M. Величина s зависит от концентрации раствора вследствие гидродинамического взаимодействия молекул. Значение s, экстраполированное к нулевой концентрации,

$$s_0 = \lim_{c \to 0} s, \tag{3.64}$$

называется *константой седиментации*. Она тем выше, чем больше M. Так, значения s_0 для миоглобина 2,0 S, для гемоглобина 4,5 S, для фикоэритрина 12,0 S. Соответствующие значения м. м. 17 600, 68 000, 290 000.

При меньших скоростях вращения ультрацентрифуги может установиться равенство встречных седиментационного и диффузионного потоков. При достаточно больших коэффициентах диффузии равновесие устанавливается быстро и наблюдается равновесное распределение вещества.

Если c — концентрация растворенного полимера на расстоянии x от оси вращения, то число молекул, седиментирующих за время dt через единицу поверхности, перпендикулярной оси x, равно

$$c\frac{dx}{dt}dt,$$

где dx/dt — скорость седиментации на расстоянии x. За то же время dt количество диффундирующего через то же сечение растворенного вещества равно $D(dc/dx)dt$. В равновесии

$$c\frac{dx}{dt} = D\frac{dc}{dx}. \tag{3.65}$$

Но, согласно (3.62) и (3.63),

$$\frac{dx}{dt} = s\omega^2 x = \frac{M\left(1-\overline{V}_{\text{м}}\rho_0\right)}{RT}D\omega^2 x. \tag{3.66}$$

Подставляя (3.66) в (3.65), получаем второе уравнение Сведберга, уже не содержащее коэффициента диффузии D:

$$M = \frac{RT}{\left(1-\overline{V}_{\text{м}}\rho_0\right)\omega^2 x}\frac{d\ln c}{dx}. \tag{3.67}$$

Интегрируя это уравнение в интервале между x_1 и x_2, находим

$$M = \frac{2RT}{\left(1-\overline{V}_{\text{м}}\rho_0\right)\omega^2}\frac{\ln\left(c_2/c_1\right)}{x_2^2-x_1^2}. \tag{3.68}$$

В методе Арчибальда, требующем меньших затрат вещества и времени, исследуется не само равновесие, а приближение к нему. Потоки вещества через мениск и дно кюветы нулевые, независимо от достижения равновесия. Из (3.65) и (3.66) следует

$$\frac{1}{x_m}\frac{1}{c_m}\left(\frac{dc}{dx}\right)_m = \frac{1}{x_0}\frac{1}{c_0}\left(\frac{dc}{dx}\right)_0 = \frac{s\omega^2}{D}. \tag{3.69}$$

Индекс m относится к мениску, 0 — к дну кюветы. Из (3.69) и (3.66) получаем

$$\begin{aligned} M &= \frac{RT}{\left(1-\overline{V}_{\text{м}}\rho_0\right)\omega^2}\frac{(dc/dx)_m}{x_m c_m}, \\ M &= \frac{RT}{\left(1-\overline{V}_{\text{м}}\rho_0\right)\omega^2}\frac{(dc/dx)_0}{x_0 c_0}. \end{aligned} \tag{3.70}$$

Для гомогенного полимера эти два значения M совпадают.

Для биофизики важен метод *седиментации в градиенте плотности*. В концентрированном растворе низкомолекулярного вещества (в CsCl, в сахарозе и т. д.) при ультрацентрифугировании устанавливается градиент концентрации, т. е. градиент плотности растворителя макромолекул $d\rho_0/dx$. В таком растворе макромолекулы будут располагаться в той части кюветы, в которой $s = 0$, т. е. согласно (3.66), $\overline{V}_м\rho_0 = 1$ или $\rho_0 = \rho_м$. Иными словами, макромолекулы локализуются в той области кюветы, где плотность концентрированного раствора совпадает с плотностью макромолекул ($\rho_м$ измеряется непосредственно). Гетерогенная смесь макромолекул разделяется и наблюдается спектр плотностей. Этот метод с большой эффективностью применяется при изучении нуклеиновых кислот.

Диффузия описывается уравнением Фика

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\frac{\partial^2 c}{\partial x^2}. \qquad (3.71)$$

С помощью (3.71) находится D. Градиент концентрации и скорость ее изменения определяются оптическими методами. В специальной кювете осторожно наслаивают чистый растворитель на раствор и исследуют преломление или интерференцию света.

Для реальных растворов достаточно высокой концентрации вместо формулы Эйнштейна (3.61) справедливо выражение (ср. (3.56))

$$D = \frac{1}{\varkappa}(RT + 2BMc + 3CMc^2 + \ldots), \qquad (3.72)$$

т. е. D зависит от концентрации. Коэффициент трения $\varkappa$ зависит от формы макромолекулы и ее проницаемости для растворителя. Для твердых сфер радиуса r справедлив закон Стокса

$$\varkappa_{сф} = 6\pi\eta_0 r. \qquad (3.73)$$

Для несферических частиц коэффициенты трения различны для направлений движения, совпадающих с продольной и поперечной осями частицы. Средний коэффициент трения для эллипсоида больше, чем для сферы того же объема. Для длинных стержнеобразных молекул коэффициент трения и вязкость особенно велики.

Информацию о м. м. и форме макромолекул дают оптические методы исследования. Интенсивность света, рассеянного раствором полимера, зависит от M. Вследствие рассеяния интенсивность света, проходящего через раствор, ослабляется по закону

$$I = I_0\exp(-\chi l), \qquad (3.74)$$

где I_0 — интенсивность падающего света, l — путь, проходимый лучом света в растворе, χ — коэффициент мутности. Теория рассеяния света дает

$$\chi = \frac{8\pi}{3}HcM_w \qquad (3.75)$$

где

$$H = \frac{4\pi^2 n_0^2}{N_A \lambda^4}\left(\frac{dn}{dc}\right)^2. \qquad (3.76)$$

Здесь n_0 и n — показатели преломления растворителя и раствора, λ — длина волны света, N_A — постоянная Авогадро. Значение M находится из измерения коэффициента мутности.

При рассеянии света макромолекулами, размеры которых соизмеримы с длиной волны света, наблюдается *эффект Ми* — специфическая угловая зависимость интенсивности рассеянного света: бóльшая интенсивность света, рассеянного вперед, чем назад. Эффект Ми определяется интерференцией световых волн, которые рассеиваются разными частями молекулы с различающимися фазами.

С эффектом Ми связан забавный эпизод в истории биофизики. В спектре крови не удавалось наблюдать некоторые полосы поглощения, свойственные гемоглобину в растворе. На этом основании утверждалось, что гемоглобин в эритроцитах находится в измененном состоянии. В дальнейшем выяснилось, что поглощение света гемоглобином маскировалось эффектом Ми — усиленным рассеянием света вперед эритроцитами.

Дебай вычислил функцию рассеяния $P(\vartheta)$, т. е. отношение интенсивности света, рассеянного под углом ϑ, к интенсивности падающего света:

$$P(\vartheta) = I_\vartheta / I_0, \qquad (3.77)$$

для макромолекул различной формы — для сфер, эллипсоидов, стержней. Измерение функции рассеяния дает возможность определить форму макромолекулы. Метод Зимма позволяет одновременно измерять м. м. и размеры макромолекул.

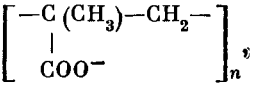
Весьма ценную информацию о биополимерах дает изучение рассеяния рентгеновских лучей их растворами (см. гл. 5).

Для определения формы макромолекул (а также их анизотропной поляризуемости) пользуются и двойным лучепреломлением в потоке (*динамооптический эффект Максвелла*). Динамооптиметр представляет собой два коаксиальных цилиндра, между стенками которых находится исследуемая жидкость — раствор полимера. Внутренний цилиндр — ротор — вращается вокруг общей оси, увлекая за собой жидкость. В ней устанавливается градиент скорости — слой, примыкающий к стенке ротора, движется с наибольшей скоростью, слой, примыкающий к стенке неподвижного цилиндра, неподвижен. В результате макромолекулы ориентируются в растворе и подвергаются растягивающему усилию. Жидкость становится анизотропной, подобной двухосному кристаллу. Двойное лучепреломление наблюдается в направлении, параллельном оси динамооптиметра. Его измерение дает указанные сведения.

Напротив, метод двойного лучепреломления в электрическом поле (эффект Керра) мало перспективен в случае биополимеров. Биополимеры являются полиэлектролитами — макромолекулы несут на себе заряды и поэтому не только ориентируются, но и перемещаются в электрическом поле.

§ 3.7. Полиэлектролиты

Многие макромолекулы, в том числе белки и нуклеиновые кислоты, в водном растворе являются макроионами, несут множество заряженных групп. Такова, например, полиметакриловая кислота



являющаяся полианионом. Биополимеры представляют собой полиамфолиты, т. е. они содержат и анионные, и катионные группы. В белках фигурируют кислотные (Глу, Асп, Тир) и основные (Арг, Гис, Лиз) остатки (см. с. 25), в нуклеиновых кислотах наличествуют кислотные фосфатные группы и основные группы $N\equiv$, $HN=$, H_2N— азотистых оснований.

Существуют как твердые макроионы (глобулярные белки и др.), так и гибкие полиэлектролитные цепи. Очевидно, что свойства таких макромолекул существенно зависят от взаимодействия содержащихся в них зарядов. Величины этих зарядов определяются степенями диссоциации ионогенных групп и окружающей их ионной атмосферой.

Конформация гибкой полиэлектролитной цепи определяется условием минимума для суммы конформационной и электрической свободной энергий. Естественно, что наличие одноименных зарядов в цепи означает их взаимное отталкивание, которое приводит к развертыванию клубка, к увеличению его размеров. Электростатическая свободная энергия клубка вычисляется с учетом ионной атмосферы. Флори построил теорию размеров цепей полиэлектролитов, сходную с предложенной им же теорией объемных эффектов (с. 77). Предполагается, что клубок вместе с иммобилизованным им растворителем в целом электрически нейтрален. Расчет показывает, что электростатические взаимодействия не могут превратить клубок в вытянутую цепь — происходит лишь раздувание клубка. Это согласуется с экспериментальными данными — с зависимостью характеристической вязкости $[\eta]$ от м. м. В более строгой статистической теории заряженных макромолекул учитывается, что из-за экранирования противоионами заряженные группы макромолекулы, расположенные далеко друг от друга по цепи, взаимодействуют лишь при случайном их сближении в результате флуктуаций. Из этой теории следует, что конформационные свойства заряженных макромолекул занимают

промежуточное положение между свойствами ненабухших статистических клубков и жестких стержней. Для полиэлектролитов $\bar{h}^2 \sim M^{4/3}$ и $[\eta] \sim M$ (ср. с. 79). Эти результаты согласуются с опытом (в частности, для денатурированной ДНК). Квадрат коэффициента линейного набухания пропорционален $I^{-2/3}$ (I — ионная сила, с. 29).

Наибольшая степень развертывания макромолекулы полиэлектролита достигается при низкой ионной силе. На рис. 3.12

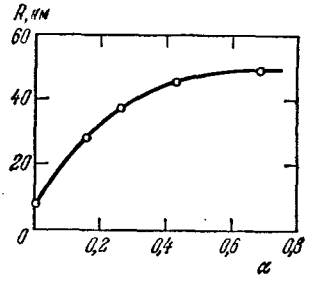


Рис. 3.12. Зависимость радиуса инерции молекул метакриловой кислоты от степени диссоциации карбоксильных групп

показано влияние заряда на радиус инерции макромолекулы полиметакриловой кислоты. Эти данные получены методом светорассеяния для растворов, не содержащих солей. Степень диссоциации поликислоты регулируется добавлением основания. При этом, конечно, ионная сила не остается постоянной.

Набухание клубка увеличивается с разбавлением раствора, так как уменьшение концентрации полиэлектролита при постоянной степени диссоциации означает уменьшение ионной силы. Для получения информации о структуре и свойствах макромолекул полиэлектролитов в растворах пользуются изоионным разбавлением: раствор полиэлектролита разбавляется раствором соли с ионной силой, равной ионной силе наиболее концентрированного раствора полиэлектролита, с тем, чтобы сохранить постоянной общую концентрацию противоионов. В этих условиях $(\eta - \eta_0)/\eta_0 c$ линейно зависит от c.

Противоионы могут связываться заряженными группами полиэлектролита специфически — такое связывание зависит от химической природы и макроиона, и малого иона. Следует отличать это специфическое связывание, сводящееся к образованию солевых связей в фиксированных точках макромолекулы, от неспецифического связывания — образования ионной атмосферы. В солевой связи противоион находится на значительно меньшем расстоянии от заряженной группы полиона, чем расстояние между этой группой и подвижными противоионами. Специфическое связывание противоионов определяет ионообменные свойства полиэлектролитов, имеющие важные практические применения. Сшитые поперечными связями нерастворимые полиэлектролиты, набухающие в воде или в других жидких средах, применяются в качестве ионообменных смол или *ионитов*. Иониты способны сорбировать определенные ионы из растворов, что находит применение при

очистке и разделении различных электролитов и при очистке неэлектролитов от ионных примесей.

В полиамфолитах и, следовательно, в биополимерах возможно образование солевых связей между катионными и анионными группами в одной цепи или в разных цепях. Исследования строения и свойств биополимеров обязательно должны учитывать их полиамфолитную природу, а, значит, pH и ионную силу среды. Структура нативных (т. е. биологически функциональных) молекул белков и нуклеиновых кислот в значительной мере определяется электростатическими, ионными, взаимодействиями. Не менее важны взаимодействия с малыми ионами окружающей среды. Взаимодействие белков с ионами K^+, Na^+, Ca^{++}, Mg^{++} определяет важнейшие биологические явления, в частности, генерацию и распространение нервного импульса и мышечное сокращение. Функциональная структура нуклеиновых кислот и их участие в биосинтезе белка также связаны с катионами щелочных и щелочноземельных металлов.

Свойства полиэлектролитов позволяют моделировать механохимические процессы, в частности, мышечное сокращение (см. гл. 12).

Полиэлектролитными свойствами белков определяется возможность их разделения и исследования методом *электрофореза*.

Глава 4

ФИЗИКА БЕЛКА

§ 4.1. Задачи физики белка

Белки — непременные участники всех процессов жизнедеятельности. Белки-*ферменты* катализируют все химические, электрохимические и механохимические процессы в клетках и в организмах. Важнейшей функцией белков можно считать ферментативную. Специализированные ферменты служат катализаторами всех метаболических реакций, репликации ДНК, транскрипции текста ДНК в текст мРНК, трансляции этого текста при биосинтезе белка. Белки являются и регуляторами генетических функций нуклеиновых кислот. Регуляторные ферменты, называемые *аллостерическими* (гл. 6), обеспечивают обратные связи в метаболических цепях.

Движение клеток и организмов, выполнение ими механической работы (например, мышечной) производятся особыми сократительными белками, служащими рабочими веществами этих процессов. Сократительные белки выполняют ферментативную, АТФ-азную функцию, реализуют превращение химической энергии (запасенной в АТФ, с. 40) в механическую работу. «Зарядка аккумулятора», т. е. окислительное фосфорилирование, происходит в мембранах митохондрий при непременном участии ферментов дыхательной цепи. Окислительно-восстановительные ферментативные процессы происходят и при фотосинтезе. Другие мембранные белки ответственны за активный транспорт молекул и ионов сквозь мембраны и, тем самым, за генерацию и распространение нервного импульса. Белки определяют все метаболические и биоэнергетические процессы.

В организмах животных некоторые специальные белки выполняют особые функции. Белки служат для запасания (миоглобин) и переноса (гемоглобин, гемоцианин) кислорода. Некоторые низкомолекулярные белки, точнее, полипептиды, являются гормонами (с. 50). Гамма-глобулины высших организмов защищают их от чужеродных биополимеров, функционируя в качестве антител — в иммунных процессах. Наконец, белки, входящие в состав соединительной ткани, хрящей и сухожилий, а также белки кожи, волос и перьев выполняют опорную функцию, обеспечивая надежную и в то же время подвижную взаимосвязь органов, целостность организма и его защиту от внешних воздействий.

Можно сказать, что белки являются обязательными участниками запасания, передачи, трансформации и рецепции химических сигналов — макромолекул, молекул и ионов — в живых системах. Во многих случаях сигналами, их рецепторами и преобразователями служат сами белки. Белки, входящие в состав рецепторных систем организма, перекодируют внешние сигналы на химический и электрохимический язык.

Молекулы белков — самые сложные из известных науке. Их биологически функциональная пространственная структура, а также структура надмолекулярных систем, содержащих белки (мембраны и др.), определяются как химическими связями в белковых цепях, так и целой гаммой слабых взаимодействий. Нативные белки никогда не являются статистическими клубками. Белковые глобулы — апериодические кристаллы сложной структуры. Это не статистические, но динамические системы, своего рода машины, поведение которых зависит от положения и свойств всех их элементов. Наряду с глобулярными существуют фибриллярные белки — сократительные и опорные.

Денатурация белка, т. е. утрата им биологической функциональности при нагревании, воздействии кислот, оснований и других веществ, состоит в разрушении слабых взаимодействий и в конечном счете в превращении конденсированного тела (глобулы или фибриллы) в статистический клубок.

Определим основные задачи физики белка.

1. Теоретическое и экспериментальное исследование структуры белковых молекул и содержащих такие молекулы надмолекулярных систем.
2. Исследование динамического поведения белковых молекул и белковых кристаллов. Изучение денатурации белков.
3. Установление связи между первичной и высшими структурами белков в их нативном состоянии.
4. Изучение физических аспектов возникновения и изменений белков в ходе биологической эволюции.
5. Изучение взаимодействий белков с нуклеиновыми кислотами как факторов, определяющих регуляцию генов.
6. Изучение физических механизмов, лежащих в основе различных биологических функций белков, прежде всего ферментативной активности.
7. Изучение физических аспектов *белковой инженерии* — методов получения белков с заданными свойствами.

Решение этих задач будет означать раскрытие сущности биологических явлений на молекулярной основе.

§ 4.2. Конформации полипептидной цепи

Для понимания структуры белка необходимо рассмотреть возможные конформации полипептидной цепи. Они определяются, прежде всего, плоским строением пептидной связи —CO—NH— (с. 32). Структурные параметры пептидных единиц, установлен-

ные в результате рентгенографического исследования пептидов и родственных им соединений, приведены в табл. 4.1.

Смысл обозначений C^{α} и C^{β} ясен из рис. 4.1; X и Y — атомы, с которыми связан C^{α} как в основной цепи, так и в привеске R. Полностью вытянутая цепь (без деформации валентных углов

Таблица 4.1. **Структурные параметры пептидных единиц: длины связей и углы между ними**

Связи	Длины, нм	Углы, град		Связи	Длины, нм	Углы, град	
C^{α}—C	0,153	$C^{\alpha}CN$	114	N—H	0,100	CNH	123
C—N	0,132	OCN	125	C^{α}—C^{β}	0,154	HNC^{α}	114
N—C^{α}	0,147	$C^{\alpha}CO$	121	C^{α}—H	0,107	$XC^{\alpha}Y$	109,5
C=O	0,124	CNC^{α}	123				

и изменений длин связей) имеет *транс*-конформацию с нулевыми значениями углов поворота ϕ, ψ и ω (рис. 4.1).

Однако такая конформация не является наиболее стабильной. Атомы H иминных групп N—H образуют *водородные связи* с атомами O карбонильных групп:

$$>C{=}O\cdots H{-}N<$$

(см. § 4.3).

Нахождение наиболее устойчивой конформации полипептидной цепи требует минимизации ее полной энергии, включая энергию внутримолекулярных водородных связей.

Полинг и Кори определили наиболее устойчивые конформации полипептидной цепи, основываясь на данных рентгеноструктурных исследований и на рассмотрении плотной упаковки цепей с максимальным числом водородных связей. Таких конформаций три. Это, во-первых, *α-спираль*, показанная на рис. 4.2. Она характеризуется поворотом вокруг оси на 100° и перемещением вдоль оси на 0,15 нм на каждое пептидное звено. Соответственно на один полный виток спирали приходится 3,6 пептидной единицы и смещение вдоль оси на 0,54 нм. Водородные связи образованы между C=O-группой данной единицы и H—N-группой четвертой предшествующей единицы. Такие связи реализуются между всеми аминокислотными остатками, за исключением пролила (Про), не содержащего N—H-группы. α-Спираль может быть правой и левой. В первом случае $\phi = 132°$, $\psi = 123°$, во втором — $\phi = 228°$, $\psi = 237°$ (углы отсчитываются от плоской *транс*-конформации цепи). Конформация α-спирали определяется, в частности, плоским расположением атомов —CO—NH—.

Вторая и третья конформации с максимальным насыщением водородных связей — *параллельная* и *антипараллельная* β-*формы* — показаны на рис. 4.3 и 4.4. Это конформации уже не от-

дельной цепи, но совокупности цепей, образующих слоистую структуру. Цепи в β-формах не имеют плоского, *транс*-строения (рис. 4.5). В параллельной β-форме $\varphi = 61°$, $\psi = 239°$, в антипараллельной $\varphi = 380°$, $\psi = 325°$.

Очень важна возможность образования β-формы и в отдельной полипептидной цепи в результате ее систематических изгибов. Схематическое изображение такой *кросс-β-формы* показано на рис. 4.6. В местах изгибов углы поворотов имеют значения, отличные от свойственных упорядоченным участкам.

Таким образом, водородные связи стабилизуют выделенные конформации полипептидной (белковой) цепи в растворе. Выделенную конформацию принято называть *вторичной структурой* цепи. Наличие вторичной структуры, имеющей периодичность, означает сходство цепи с кристаллом: α-спираль подобна одномерному, а β-форма — двумерному кристаллу.

α- и β-формы не единственные. В частности, фибриллярные белки (§ 4.9) обладают другими конформациями. Рассмотрим теперь зависимости энергий полипептидной цепи от углов внутреннего вращения φ и ψ — так на-

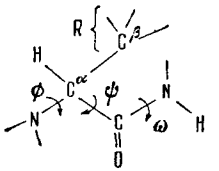


Рис. 4.1. Фрагмент белковой цепи

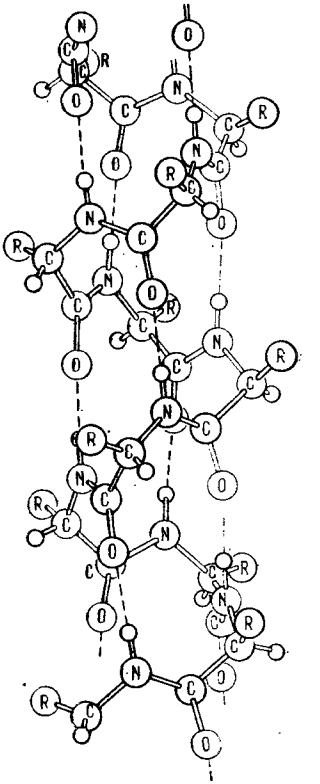


Рис. 4.2. Схема α-спирали

зываемые стерические карты, подобные геодезическим.

Конформационная энергия цепи определяется слабыми взаимодействиями валентно несвязанных атомов. Вследствие плоского строения пептидной группы углы поворота φ_i, ψ_i i-го звена практически не зависят от углов φ_{i+1}, ψ_{i+1} соседнего звена. Если углы φ_i, ψ_i варьируют в области значений, не запрещенных перекрыванием атомов пептидных групп, соединенных связями i-го и $(i+1)$-го звеньев, и если одновременно варьируют углы φ_{i+1}, ψ_{i+1}, то не существует такой комбинации этих четырех углов, при которой возможно стерическое взаимодействие i-го звена с $(i+2)$-м. Тем самым полипептидная цепь имеет ограниченную

кооперативность, ближние взаимодействия в ней ограничены ближайшими соседями. Это позволяет рассматривать порознь конформационные энергии для отдельных аминокислотных остатков. Стерическая карта для данного остатка существенно зависит от

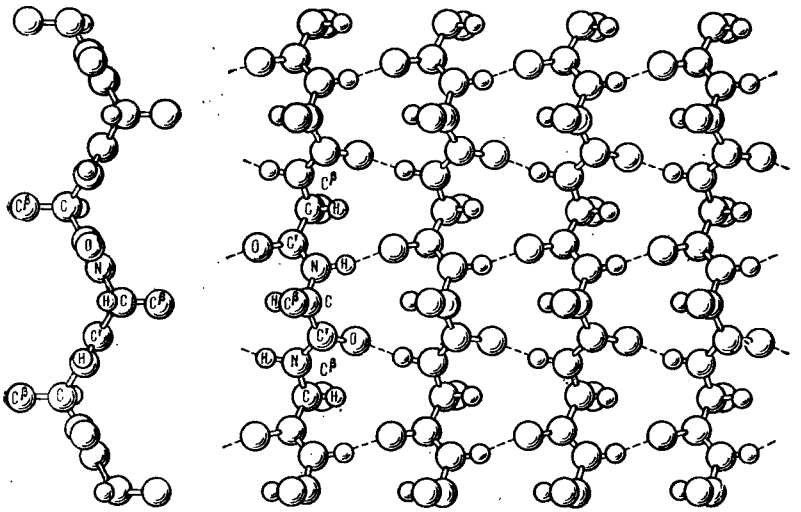


Рис. 4.3. Схема параллельной β-формы. Слева — отдельная цепь

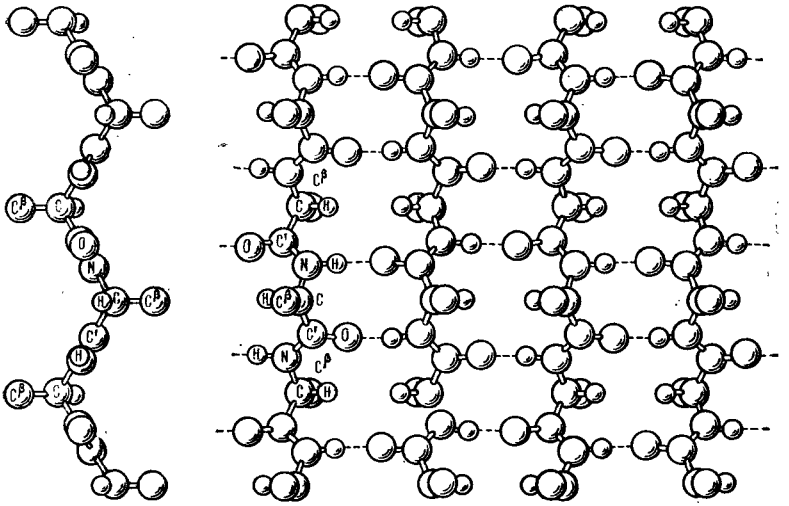


Рис. 4.4. Схема антипараллельной β-формы. Слева — отдельная цепь

природы его радикала R. Можно считать, что взаимодействия в данной паре пептидных групп характеризуют аминокислотный остаток, соединяющий эти группы. Рамачандран исследовал ди-

пептид глицил-*L*-аланин и получил конформационную (стерическую) карту для аланина. Расчет проводился на основе простейшего предположения об атомах как твердых сферах, имеющих ван-дер-ваальсовы радиусы, определяемые из данных по межатомным расстояниям в молекулярных кристаллах. В табл. 4.2

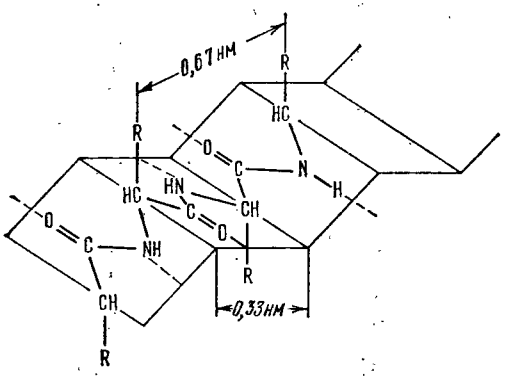


Рис. 4.5. Структура полипептидной цепи в β-форме

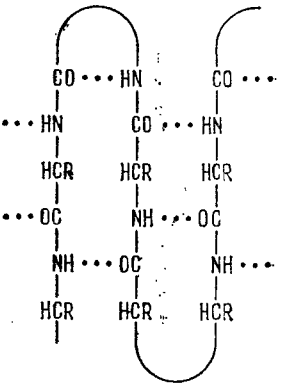


Рис. 4.6. Схема *кросс*-β-формы

приведены эти расстояния, чаще всего наблюдаемые в кристаллах, и минимальные расстояния, наблюдаемые лишь в немногих случаях.

Пользуясь потенциалом твердых сфер, можно, очевидно, получить только разрешенные и запрещенные области значений ϕ

Таблица 4.2. **Контактные расстояния между атомами в полипептидах**

Пара атомов	Обычное расстояние, нм	Минимальное расстояние, нм	Пара атомов	Обычное расстояние, нм	Минимальное расстояние, нм
C C	0,32	0,30	O N	0,27	0,26
C O	0,28	0,27	O H	0,24	0,22
C N	0,29	0,28	N N	0,27	0,26
C H	0,24	0,22	N H	0,24	0,22
O O	0,28	0,27	H H	0,20	0,19

и ψ. На рис. 4.7 показана такая карта для аланина. Сплошными линиями обведены области, разрешенные при обычных межатомных расстояниях, пунктирными — при минимальных расстояниях. На карте указаны значения ϕ и ψ для правой и левой α-спиралей (α_D и α_L), параллельной и антипараллельной β-форм ($\beta_п$ и $\beta_{ап}$) и для фибриллярного белка — коллагена (К). Аналогичные карты были получены для других остатков. Естественно, что с увеличением размера радикала R область разрешенных значений ϕ и ψ уменьшается.

Более строгие расчеты проводились с помощью потенциала (ср. с. 63)

$$U(\phi, \psi) = {}^1/_2 U^0_\phi (1 - \cos 3\phi) + {}^1/_2 U^0_\psi (1 - \cos 3\psi) + \sum_{i,j} U(r_{ij}) + U_К. \quad (4.1)$$

Потенциал $U(r_{ij})$ можно взять в форме «6—12» Леннард-Джонса или «6 — exp» (с. 64); $U_К$ характеризует кулоновское,

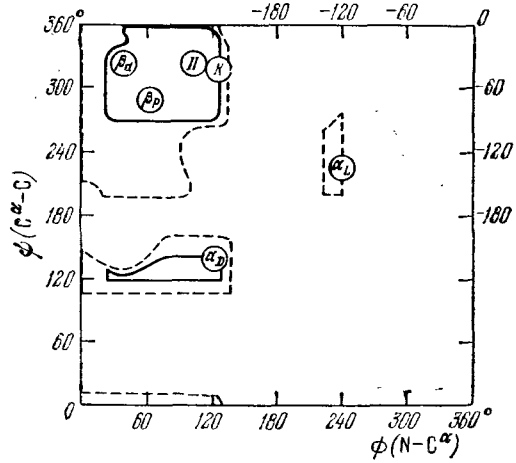


Рис. 4.7. Стерическая карта для *L*-аланина (Рамачандран)

электростатическое взаимодействие между соседними парами пептидных групп, определяемое их большими дипольными моментами, достигающими 3,7 D.

Барьеры U^0_ϕ и U^0_ψ находят из данных, полученных при исследовании модельных малых молекул. По-видимому, $2{,}1 < U^0_\phi < 5{,}5$ кДж/моль (2,1 — барьер для $H_3C—CO—OH$; 5,5 — для $H_3C—CO—Cl$); $U^0_\psi < 6{,}3$ кДж/моль. Эти барьеры малы, заметно меньше, чем для углеводородов.

Константы для потенциала «6—12» представлены в табл. 3.2 (с. 64). Расчет $U_К$ затруднен тем, что неизвестно значение диэлектрической проницаемости ε, фигурирующей в законе Кулона:

$$U_К = \sum_{i,j} \frac{e_i e_j}{\varepsilon r_{ij}}, \quad (4.2)$$

где e_i, e_j — заряды на атомах i и j. Если между взаимодействующими атомами нет других атомов или молекул растворителя (воды), то $\varepsilon \approx 3$. Это значение соответствует углеводородному, органическому окружению.

Для атомов O и N, соединенных водородной связью, можно воспользоваться функцией $U_{в.с.} = U_{ij} + U_К$, определяемой из зна-

чений энергии водородной связи, и равновесными расстояниями O····H—N.

Выражение (4.1) не учитывает искажений длин связей и валентных углов, которые, по-видимому, малы. Оно характеризует изолированную полипептидную цепь. При наличии водного окружения следует учитывать изменение свободной энергии молекул

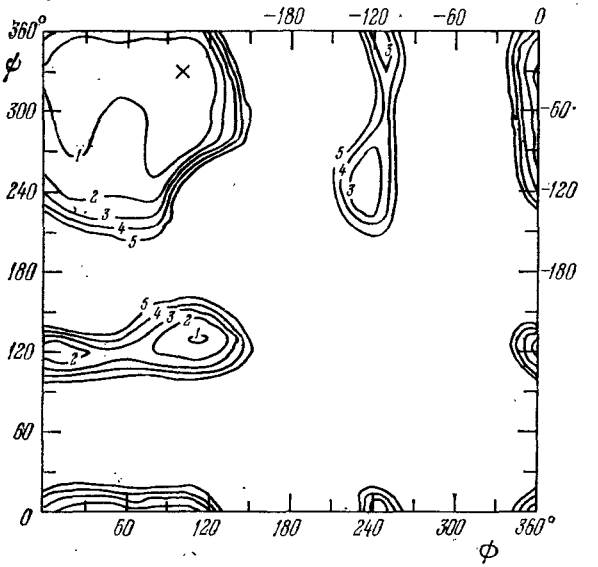


Рис. 4.8. Стерическая карта для *L*-аланина (Флори)

H_2O, удаляемых из сольватной оболочки при контакте между атомами. Строго говоря, нужно минимизировать сумму внутримолекулярной потенциальной энергии и свободной энергии растворителя.

На рис. 4.8 показана стерическая карта для аланина. Цифры у кривых указывают значение (в ккал/моль) энергии U (4.1). Проведены геодезические линии, отвечающие энергиям от 4 до 20 кДж/моль. Крестиком отмечен минимум энергии. Поучительно сравнить карты рис. 4.8 и 4.7.

§ 4.3. Водородная связь и структура воды

Итак, вторичные структуры белковых цепей стабилизованы водородными связями, играющими также большую роль в конформационном строении нуклеиновых кислот и углеводов.

Биополимеры функционируют в водном окружении. Особые свойства воды, благодаря которым она является незаменимой компонентой клеток и организмов, также определяются водородными связями. Остановимся на природе и свойствах водородной связи (см. с. 58).

Наличие водородных связей сильно сказывается на физических и физико-химических свойствах веществ. Межмолекулярные водородные связи определяют ассоциацию молекул. Ассоциированные вещества характеризуются сравнительно большими теплотами испарения, высокими температурами плавления и кипения и большими их разностями. Сравним четыре вещества (табл. 4.3), состоящие из *изоэлектронных молекул*. Метан — неассоциированное вещество, остальные ассоциированы водородными связями.

Таблица 4.3. **Свойства изоэлектронных веществ**

Вещество	$T_{пл}$, К	$T_{кип}$, К	Молярная теплота испарения, кДж/моль	Молярный объем, $см^3$/моль
Фтористый водород HF	181	292	30,2	20,2
Вода H_2O	273	373	40,8	18,0
Аммиак H_3N	195	240	23,4	20,8
Метан H_4C	89	112	9,3	34,0

Сравним свойства двух изомерных веществ: этанола и диметилэфира (табл. 4.4). В этанол входит группа OH, образующая водородную связь. В диметилэфире таких связей нет.

Вещества, ассоциированные водородными связями, имеют большие значения диэлектрических проницаемостей ε. Так, при 20°C

Таблица 4.4. **Свойства этанола и диметилэфира**

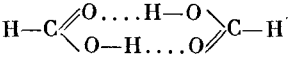
Вещество	$T_{пл}$, К	$T_{кип}$, К	Молярная теплота испарения, кДж/моль
Этанол C_2H_5OH	161	351	42,8
Диметилэфир $(CH_3)_2O$	135	249	18,7

ε воды — 80, HCN — 95, формамида $HCONH_2$ — 84, NH_3 — 15,5. В то же время ε для диэтилэфира $(C_2H_5)_2O$ равна 4,3.

Структурные исследования кристаллов, содержащих водородные связи, показывают, что при связывании атомом водорода двух электроотрицательных атомов A и B (O, N, F, Cl) расстояние между ними r_{AB} меньше суммы ван-дер-ваальсовых радиусов. Суммы этих радиусов равны: OO — 0,28, ON — 0,30, NN — 0,33 нм. При наличии водородных связей расстояние уменьшено в O—H···O до 0,255, в O—H···N до 0,280, в N—H···O до 0,288, в N—H···N до 0,310 нм.

Водородная связь ярко проявляется в оптических спектрах и в спектрах ЯМР. Характеристические частоты колебаний групп, содержащих атом H, например, O—H-, N—H-групп, понижаются,

если водород образует водородную связь. Так, в мономерной муравьиной кислоте H—CO—OH частота колебаний группы O—H равна 3682 $см^{-1}$, а в димере, стабилизованном водородными связями,



она равна 3080 $см^{-1}$. Меняются и другие частоты мономера. Инфракрасные полосы поглощения O—H-групп сильно расширяются при образовании водородной связи, их интенсивности сильно возрастают. Водородная связь влияет на электронные спектры, сдвигая $\pi\pi^*$-переходы (ср. с. 142) в коротковолновую сторону. В спектрах протонного магнитного резонанса (ПМР) наблюдаются химические сдвиги, вызванные водородной связью. Спектроскопия ПМР — наилучший метод изучения водородных связей.

Энергия водородных связей определяется из термодинамических свойств соответствующих веществ, из спектров и т. д. Термодинамические функции выражаются через константу равновесия

$$K = \frac{\text{Активность соединения}}{\text{Произведение активностей реагентов}} \approx \frac{[A—H\cdots B]}{[AH][B]}. \qquad (4.3)$$

Квадратные скобки обозначают концентрации. Свободная энергия образования водородной связи

$$\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S = -RT \ln K, \qquad (4.4)$$

где ΔH — энтальпия, ΔS — энтропия образования связи. Из (4.4) следует

$$\Delta H = RT^2 \left(\frac{\partial \ln K}{\partial T}\right)_p. \qquad (4.5)$$

Значения ΔH порядка 12—30 кДж/моль: для воды 11,8, для льда 25,6, для аммиака 15,5—18,5, для HF 28,1—29,4 кДж/моль.

Водородная связь с углеродом образуется лишь в немногих случаях (HCN, хлороформ $CHCl_3$ в смеси с пиридином C_5H_5N и др.).

Водородная связь всегда соединяет два электроотрицательных атома. Атом H не обобществляется полностью атомами A и B; обозначение A—H···B, в котором сплошная черта означает ковалентную связь, а пунктир — водородную, имеет реальный смысл. Рентгенография не позволяет непосредственно определить положение атома H (см. с. 132), но оно устанавливается методом нейтронографии (с. 139). В системе O—H···O, например, ковалентная связь существенно короче и, значит, прочнее водородной.

В системе происходят переходы

$$O—H\cdots O \rightleftarrows O\cdots H—O.$$

Кривая зависимости энергии от положения атома водорода в системе O—H···O (скажем, в димере муравьиной кислоты) имеет два симметричных минимума, разделенных барьером. Квантовая механика позволяет рассмотреть водородную связь количествен-

но, вычислить ее энергию и длину в разумном согласии с опытом. Водородная связь имеет сложный характер, в ее энергию вносят вклады и электростатические, и дисперсионные, и квантовомеханические (определяемые делокализацией протона и электронов) взаимодействия.

Структура воды и льда определяется водородными связями. Каждая молекула воды может образовать четыре водородных связи с соседними молекулами (рис. 4.9), расположение этих связей тетраэдрическое. Обычный лед (лед I) имеет гексагональную кристаллическую решетку, каждый атом кислорода в решетке расположен в центре тетраэдра, в вершинах которого находятся соседние атомы О. Расстояния О···О равны 0,276 нм. В элементарную ячейку входят четыре молекулы. Молекулярная решетка льда очень рыхлая, с большими пустотами, так как ее *координационное число* мало. Именно поэтому лед легче воды. Это свойство льда не уникально, им обладают также кристаллы алмаза, кремния и германия, имеющие сходное строение.

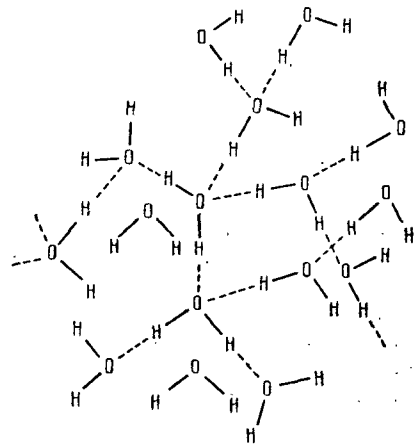


Рис. 4.9. Схема структуры воды

Льдоподобная структура сохраняется и в жидкой воде, но с тем бо́льшими нарушениями, чем выше температура. Говоря о структуре воды, следует иметь в виду масштаб времени, в котором эта структура регистрируется. В кристалле льда молекулы H_2O испытывают колебания, повороты и редкие трансляционные перемещения. На мгновенном снимке с временем экспозиции τ, много меньшим периода колебаний $\tau_{кол} \approx 2 \cdot 10^{-13}$ с, получается мгновенная, или М-, структура, показанная на рис. 4.10, *а*. За время τ, много большее $\tau_{кол}$, но значительно меньшее времени вращательной диффузии $\tau_{диф} \sim 10^{-5}$ с, колебания усредняются и мы увидим на снимке регулярно расположенные, но случайным образом ориентированные молекулы — К-структуру (рис. 4.10, *б*). Наконец, при $\tau \gg \tau_{диф}$, т. е. в обычном опыте, получится диффузионно усредненная К-структура (Д-структура) (рис. 4.10, *в*). В жидкой воде М- и К-структуры подобны кристаллическим, но Д-структура размыта перемещениями молекул. Если мысленно поместить фотокамеру на молекулу H_2O и регистрировать окружающие молекулы во время движения данной, то получится Д-структура жидкости, являющаяся усреднением ее К-структур.

Применяя различные методы исследования с разными временами опыта τ, мы будем получать сведения о различных типах

структуры (рис. 4.11). Термодинамические свойства характеризуют, естественно, Д-структуру жидкости.

Укажем, что наибольшие времена релаксации в воде имеют порядок 10^{-5} с ($\tau_{диф}$ для льда). Иногда публикуемые утверждения о том, что вода якобы «запоминает», что с ней делали —

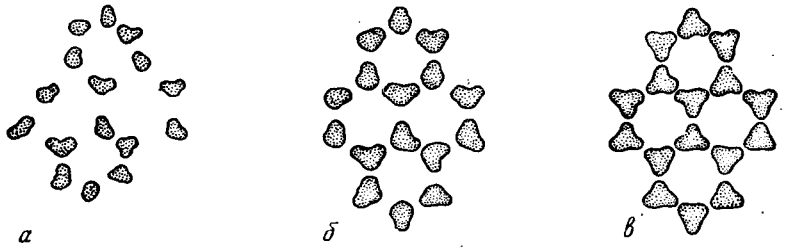


Рис. 4.10. Мгновенная (*а*), колебательно-усредненная (*б*) и диффузионно-усредненная (*в*) структуры воды

нагревали или замораживали, «омагничивали» или «диспергировали» (т. е. усиленно взбалтывали),— основаны на плохих опытах и не имеют отношения к науке, равно как и сообщения о «живой» и «мертвой» воде, получаемой посредством электролиза.

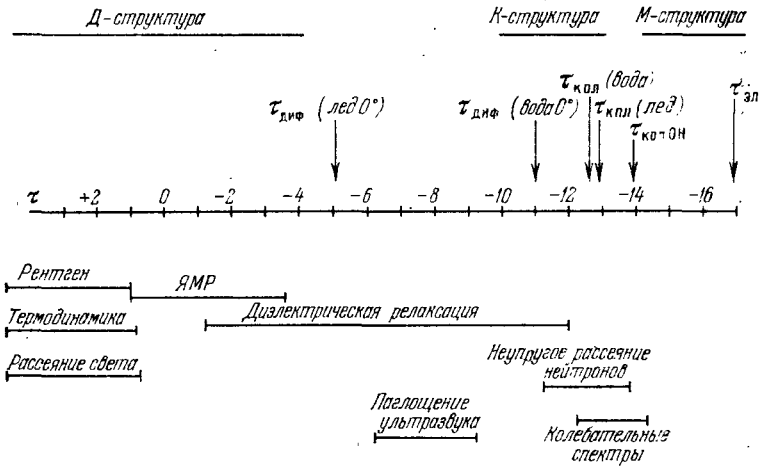


Рис. 4.11. Временные интервалы $\lg\tau$ (τ — в с), соответствующие различным методам исследования структуры воды и льда

К выдумкам относятся и особые свойства талой воды или воды, «термически активированной».

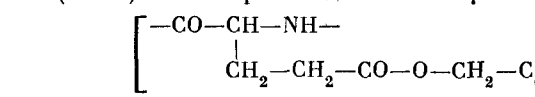
Рентгенография воды дает функцию радиального распределения, т. е. относительное содержание молекул, находящихся на тех или иных расстояниях друг от друга. При температурах от 4 до 120 °С главный максимум этой функции постепенно смеща-

ется от 0,282 до 0,294 нм. Координационное число в этом интервале равно в среднем 4,4 (укажем, что в жидком Ne это число равно 8,6, в Ar — 10,5). Таким образом, вода квазикристаллична, каждая молекула имеет в среднем четыре соседа. Предложен ряд теоретических моделей структуры воды, согласующихся с этими данными, но однозначный выбор структуры пока затруднителен. Однако можно считать установленной интерпретацию важнейших физических свойств воды и, прежде всего, зависимость удельного объема от температуры. Минимум удельного объема при 4 °С объясняется конкуренцией двух процессов. Первый — разрушение упорядоченной льдоподобной структуры с малым координационным числом (4), сопровождающееся уменьшением объема. Это — продолжение плавления. В одной модели уменьшение объема связано с заполнением полостей рыхлой решетки мономерными молекулами H_2O, в другой — изгибание водородных связей приводит к сближению соседних молекул, т. е. к уменьшению объема. Второй процесс, превалирующий при $T > 4$°С,— термическое расширение жидкости вследствие возрастания амплитуд ангармонических межмолекулярных колебаний.

§ 4.4. Переходы спираль — клубок

Конформации полипептидных цепей, стабилизованные водородными связями, устойчивы лишь в определенных условиях. Изменения температуры, растворителя, pH среды приводят к переходам порядок — беспорядок, к превращению регулярной конформации цепи в статистический клубок. Эти процессы удобно изучать на модельных гомополимерах — синтетических полиаминокислотах.

Многие полиаминокислоты, в частности полиглутаминовая кислота (ПГК) и ее производное поли-γ-бензилглутамат (ПБГ)



фигурируют в растворах в форме α-спиралей, что доказывается их гидродинамическими и оптическими свойствами. Доти установил, что переходы спираль — клубок весьма резки, сходны с фазовыми переходами — происходит своего рода плавление α-спиралей, одномерных кристаллов. На рис. 4.12 показана зависимость степени ионизации, характеристической вязкости $[\eta]$ и удельного оптического вращения $\varphi_{уд}$ ПГК от pH среды. Вблизи pH 6 происходит резкое падение $[\eta]$ и $\varphi_{уд}$ и возрастание степени ионизации. При pH 6 ПГК — спираль, при pH 6 — клубок. В отличие от ПГК, ПБГ растворяется в органических растворителях. В дихлорэтане, хлороформе, формамиде ПБГ образует жесткие стержни — α-спирали. Напротив, в растворителях, молекулы которых образуют с ПБГ водородные связи,— в трихлоруксусной кислоте и др.— ПБГ находится в форме клубков. При постепенном изме-

нении состава растворителя, например, бинарной смеси $CHCl_3$ и $CH_2ClCOOH$, в некоторой узкой области (при 80% $CHCl_3$), спираль превращается в клубок.

Резкость перехода, S-образность соответствующих кривых (например, кривая $\varphi_{уд}$ на рис. 4.12) свидетельствуют о кооперативном характере превращения. Причина кооперативности очевид-

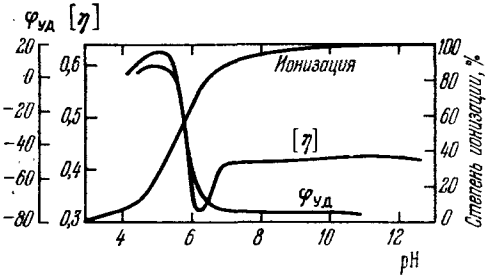


Рис. 4.12. Графики зависимости степени ионизации, $[\eta]$ и $\varphi_{уд}$ от pH среды в области перехода спираль — клубок в ПГК

на из рассмотрения строения α-спирали. Конформации пептидных звеньев цепи взаимозависимы, так как водородная связь между группой C=O i-й единицы и группой N—H $(i-4)$-й единицы фиксирует конформации $(i-1)$-й, $(i-2)$-й и $(i-3)$-й единиц. Для освобождения пептидной единицы, дающего выигрыш энтропии, необходимо разорвать не менее трех водородных связей кряду, что требует затраты энергии. Для того чтобы свободная энергия G уменьшалась, необходимо освобождение многих единиц, т. е. *кооперативность*.

Термодинамическое условие плавления кристалла состоит в равенстве свободных энергий кристалла и расплава — в нашем случае α-спирали и клубка. Имеем

$$G_\alpha = H_\alpha - T_{пл}S_\alpha = H_{кл} - T_{пл}S_{кл} = G_{кл} \qquad (4.6)$$

или

$$\Delta G = G_{кл} - G_\alpha = \Delta H - T_{пл}\Delta S = 0. \qquad (4.7)$$

Изменение энтальпии компенсируется изменением энтропии. Из (4.7) следует

$$T_{пл} = \Delta H/\Delta S. \qquad (4.7а)$$

Статистическая теория (излагаемая далее) показывает, что доля спирализованных звеньев такой кооперативной системы выражается формулой

$$\theta = \frac{s^n}{1+s^n}, \qquad (4.8)$$

где $1 < n < N$ (N — число звеньев α-спирали);

$$s = \exp(-\Delta G/RT) \qquad (4.9)$$

имеет смысл константы равновесия для образования водородной связи в звене, следующем за уже связанным звеном. Формула (4.8) описывает кооперативное плавление α-спирали, если $n \gg 1$.

В этом случае при $s=1$ происходит резкий переход: $\theta \approx 0$ при $s<1$, $\theta=0{,}5$ при $s=1$ (т. е. при $\Delta G=0$) и $\theta=1$ при $s>1$. Таким образом, формула (4.8) согласуется с термодинамическим условием плавления (4.7), т. е. с плавлением при определенной температуре.

При каких же условиях $n \gg 1$? Кооперативность велика, если велика свободная энергия, необходимая для возникновения одного разрыва в последовательности водородных связей, т. е. если мала константа равновесия σ для такого процесса:

$$\sigma = \exp(-G_{\text{разр}}/RT). \quad (4.10)$$

Расчет показывает, что

$$n \approx 1/\sqrt{\sigma}. \quad (4.11)$$

Переход тем более резок, чем меньше параметр кооперативности σ. Кооперативность максимальна, если $G_{\text{разр}} \to \infty$ и $\sigma \to 0$. При этом $n \to N$. Напротив, кооперативность полностью отсутствует, если $G_{\text{разр}} \to 0$ и $\sigma \to 1$. В этом случае $n \to 1$ и вместо формулы (4.8) получаем

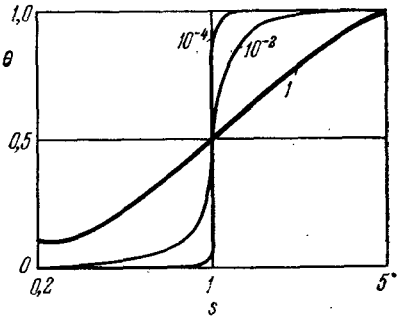


Рис. 4.13. Теоретические кривые $\theta(s)$ при разных значениях σ

$$\theta = s/(1+s); \quad (4.12)$$

θ изменяется плавно, без перегиба — плавления нет. На рис. 4.13 показаны теоретические кривые $\theta(s)$ при разных значениях σ.

Дадим статистико-механический вывод этих соотношений, основанный на модели Изинга и матричном методе (с. 73). Каждое звено полипептидной цепи может находиться в несвязанном состоянии (символ $\mu_i = 0$) и в состоянии, связанном водородными связями ($\mu_i = 1$). Свободная энергия цепи зависит от набора значений μ_i, причем взаимозависимы конформации четырех последовательных звеньев. Поэтому свободная энергия цепи равна

$$G\{\mu_i\} \equiv G(\mu_1, \mu_2, \ldots, \mu_N) = \sum_{i=1}^{N} \widetilde{G}(\mu_{i-3}, \mu_{i-2}, \mu_{i-1}, \mu_i). \quad (4.13)$$

Как и ранее (с. 74), считаем цепь весьма длинной, $N \gg 1$, и пренебрегаем концевыми эффектами. Очевидно, что свободная энергия, требуемая для освобождения одного или двух звеньев, заключенных между связанными звеньями, должна быть очень большой, так как на самом деле освобождения в этом случае нет, звенья остаются в спирали. Энтальпия затрачивается без выигрыша в энтропии. Можно положить, что

$$\widetilde{G}(\mu_{i-3}, 1, 0, 1) \to \infty, \quad \widetilde{G}(1, 0, 0, 1) \to \infty. \quad (4.14)$$

Эти состояния практически не участвуют в статистической сумме, равной

$$Z = \sum_{\{\mu_i\}} \exp(-G\{\mu_i\}/RT). \quad (4.15)$$

Отвлекаясь от этих состояний, можем ограничиться рассмотрением лишь двух соседних звеньев и упростить выражение (4.13):

$$G\{\mu_i\} = G(\mu_1, \mu_2, \ldots, \mu_N) = \sum_{i=1}^{N} \widetilde{G}(\mu_{i-1}, \mu_i). \tag{4.16}$$

Мы имеем дело лишь с четырьмя значениями $\widetilde{G}$: $\widetilde{G}(0, 0)$, $\widetilde{G}(0, 1)$, $\widetilde{G}(1, 0)$, $\widetilde{G}(1, 1)$. Считаем, что свободная энергия звена в свободном состоянии ($\mu_i = 0$) равна нулю — звено расплавилось. Имеем

$$G_{\text{своб}} = \widetilde{G}(0, 0) = \widetilde{G}(1, 0) = 0. \tag{4.17}$$

Для звена в связанном состоянии ($\mu_i = 1$)

$$G_{\text{связ}} = \widetilde{G}(1, 1) = \Delta G. \tag{4.18}$$

И, наконец, для состояния $\mu_{i-1} = 0$, $\mu_i = 1$

$$\widetilde{G}(0, 1) = G_{\text{связ}} + G_{\text{разр}}. \tag{4.19}$$

Если принить, что при вращении свободного звена вокруг каждой связи возможны три поворотных изомера, то

$$G_{\text{разр}} = 4RT \ln 3 \approx 10{,}5 \text{ кДж/моль}. \tag{4.20}$$

Эти величины входят в Z в виде экспонент: $G_{\text{своб}}$ дает множитель 1, $G_{\text{связ}}$ — множитель s (формула (4.9)) и $G_{\text{разр}}$ — множитель σ (формула (4.10)). Имеем (ср. с. 74)

$$Z = \sum_{\{\mu_i\}} \prod_{i=1}^{N} s^{\mu_i} \sigma^{\mu_i(1-\mu_{i-1})} = \mathrm{Sp}(\mathbf{P}^N) = \lambda_1^N + \lambda_2^N. \tag{4.21}$$

Матрица $\mathbf{P}$ имеет вид

$$\mathbf{P} = \begin{array}{c|cc} \mu_{i-1} \backslash \mu_i & 0 & 1 \\ \hline 0 & 1 & \sigma s \\ 1 & 1 & s \end{array}. \tag{4.22}$$

Ее характеристическое уравнение

$$(1 - \lambda)(s - \lambda) = \sigma s. \tag{4.23}$$

Собственные числа матрицы

$$\lambda_{1,2} = {}^1/_2(1 + s) \pm [{}^1/_4(1 + s)^2 + s\sigma]^{1/2}. \tag{4.24}$$

При максимальной кооперативности $\sigma = 0$ и $\lambda_1 = 1$, $\lambda_2 = s$. Имеем

$$Z = 1 + s^N \tag{4.25}$$

и

$$\theta = \frac{1}{N} \frac{\partial \ln Z}{\partial \ln s} = \frac{s^N}{1 + s^N}. \tag{4.26}$$

Если кооперативнсть отсутствует, то $G_{\text{разр}} = 0$ и $\sigma = 1$. При этом $\lambda_1 = 1 + s$, $\lambda_2 = 0$ и получаем формулу (4.12). В промежуточных случаях, когда $0 < \sigma < 1$, получаем формулу (4.8). Обозначим $s^n = \tilde{s}$. Эта величина имеет смысл константы равновесия для мономолекулярной реакции, в которой участвует n звеньев, т. е. эффективное изменение энтальпии

$$\Delta H_{\text{эф}} = n \Delta h, \tag{4.27}$$

где Δh — изменение энтальпии при освобождении одного звена. При $N \gg 1$ можно ограничиться в (4.21) бо́льшим корнем (4.24)

$$Z \approx \lambda_1^N. \tag{4.28}$$

Имеем

$$\theta = \frac{1}{N}\frac{\partial \ln Z}{\partial \ln s} \approx \frac{\partial \ln \lambda_1}{\partial \ln s} = \frac{\lambda_1 - 1}{2\lambda_1 - 1 - s}, \tag{4.29}$$

Приравняв это выражение выражению (4.8), причем

$$s^n = \tilde{s} = \exp\left(-\frac{\Delta H_{эф} - T\Delta S_{эф}}{RT}\right), \tag{4.30}$$

находим

$$\tilde{s} = (\lambda_1 - 1)/(\lambda_1 - s) \tag{4.31}$$

и

$$\Delta H_{эф} = -\frac{d \ln \tilde{s}}{d(1/RT)} = -\frac{d \ln s}{d(1/RT)}\frac{d \ln \tilde{s}}{d \ln s} = \Delta h \frac{d \ln \tilde{s}}{d \ln s}. \tag{4.32}$$

Расчет дает

$$\frac{d \ln \tilde{s}}{d \ln s} = \frac{s}{(\lambda_1 - 1)(\lambda_1 - s)} \frac{2(\lambda_1 - 1)(\lambda_1 - s) + \sigma(1 - s)}{2\lambda_1 - 1 - s} \tag{4.33}$$

и в области перехода, в которой $s \approx 1$,

$$\frac{d \ln \tilde{s}}{d \ln s} \approx \frac{2s}{2\lambda_1 - 1 - s} \approx \frac{1}{\sqrt{\sigma}}. \tag{4.34}$$

Следовательно,

$$\Delta H_{эф} \approx \frac{\Delta h}{\sqrt{\sigma}}, \tag{4.35}$$

т. е.

$$n \approx \frac{1}{\sqrt{\sigma}}. \tag{4.36}$$

Величину $\Delta H_{эф}$ можно найти по наклону кривой зависимости θ от $1/RT$ в области перехода, где $\tilde{s} \approx 1$:

$$\frac{d\theta}{d(1/RT)} = -\frac{d\theta}{d \ln \tilde{s}} \Delta H_{эф} = -\frac{\tilde{s}}{(1 + \tilde{s})^2} \Delta H_{эф} \approx -{}^1/_4 \Delta H_{эф}. \tag{4.37}$$

Оптические методы позволяют определить $\theta(T)$ и, тем самым, $\Delta h/\sqrt{\sigma}$. Для нахождения величин Δh и σ порознь можно воспользоваться зависимостью $T_{пл}$ от степени полимеризации N (Зимм и Брэгг).

Опыт дает для ПБГ $\sigma = 2 \cdot 10^{-4}$ и изменение энтальпии при освобождении одного звена Δh около 4 кДж/моль. Те же значения σ свойственны ПГК и поли-*L*-лизину. Однако Δh в этих двух случаях отрицательно и мало — около —0,29 кДж/моль. Если $\Delta h > 0$, спиральное состояние менее выгодно, чем клубкообразное, и переход спираль — клубок происходит не при повышении, а при понижении температуры.

Теория переходов, вызванных изменением растворителя или pH среды, строится на тех же основах. В первом случае необходимо учесть, что каждое звено может находиться уже не в двух, а в трех состояниях: в свободном, в связанном внутримолекулярной водородной связью и в связанном водородной связью с молекулой растворителя. Зависимость перехода от pH определяется полиэлектролитной природой таких полипептидов, как ПГК. Каждое звено может находиться в одном из четырех состояний, так как оно может быть свободным и связанным, заряженным и незаряженным. Для полиамфолитов форма кривой θ(pH) зависит от последовательности ка-

тионных и анионных звеньев. Теоретические расчеты переходов согласуются с опытом.

Переходы β-форма — клубок имеют несколько иной характер, так как β-форма двумерна. Теория этих переходов была развита Бирштейн.

Являются ли эти кооперативные переходы фазовыми? Вопрос этот не тривиален. Согласно *теореме Ландау и Лифшица*, фазовый переход в одномерной системе невозможен, так как в ней не существуют фазовые равновесия. Две фазы перемешиваются, пока не разделятся на малые конечные отрезки. Между тем α-спираль одномерна.

Фазовые переходы и фазы строго определены в статистической физике лишь для систем с $N \to \infty$. Самые длинные α-спирали содержат лишь десятки и сотни звеньев. Плавление α-спирали происходит в заметном интервале температур ΔT, определяемом лишь параметром кооперативности σ. В отличие от истинного фазового перехода, ΔT не стремится к нулю при $N \to \infty$. Тем самым плавление α-спирали есть *нефазовый кооперативный конформационный переход*. Сказанное справедливо и для двумерных β-систем.

§ 4.5. Белковая глобула и гидрофобные взаимодействия

В отличие от монотонной полиаминокислоты, белок содержит разнообразные остатки, в том числе и Про, которые не могут образовать водородных связей. Вторичные структуры — α-спирали и β-формы — представлены в белке лишь частично, они перемежаются неупорядоченными участками, в которых белковая цепь обладает значительной гибкостью. В результате белковая макромолекула сворачивается в глобулу, приобретая определенную пространственную, третичную, структуру. Именно эта структура биологически функциональна. (О фибриллярных белках мы будем говорить в § 4.9.)

В ряде случаев белок обладает *четвертичной структурой* — молекула белка или надмолекулярная белковая система состоит из некоторого числа глобул. Примеры: молекула гемоглобина содержит 4 глобулы двух сортов, белковая оболочка вируса табачной мозаики состоит из 2000 идентичных глобул. Белок — многоуровневая система.

Характер структуры на каждом уровне организации определяется геометрическими свойствами структур предыдущего уровня, силами взаимодействия их элементов и взаимодействием с окружающей средой. Возникновение «высшей» структуры происходит как бы автоматически в результате *самосборки* системы.

Решение проблем самосборки означало бы, например, возможность предсказания макроскопической структуры мышцы по данным о химическом строении ее белков. Объяснение строения молекулярных кристаллов на основе знания строения образующих эти кристаллы молекул решает проблемы самосборки в гораздо более простом случае.

Мы уже говорили об отличии полимерной глобулы от статистического клубка (с. 78). В белке вследствие полифункциональности аминокислотных остатков в образовании глобулы участвуют разнообразные силы. Разнородность звеньев и взаимодействий определяет строение глобулы — «апериодичность кристалла».

Единственные сильные взаимодействия в белковой глобуле — это химические дисульфидные связи Цис—S—S—Цис. Наличие нескольких дисульфидных «сшивок» между звеньями одной или нескольких цепей (например, инсулин) накладывает ограничения на возможные конформации. Однако нельзя было бы говорить о глобуле, если бы взаимодействия сводились к серным мостикам. В этом случае белковая цепь походила бы на цепь каучука в резине, вулканизированной серой. Каучук в резине сохраняет свойства статистического клубка. Глобула формируется слабыми силами — электростатическими, ван-дер-ваальсовыми, водородными связями и, прежде всего, *гидрофобными взаимодействиями.*

Глобулярные белки функционируют в водном окружении, в большой степени определяющем высшие уровни их структуры. Влияние воды обязательно должно учитываться в физике белка.

Вода влияет на водородные связи. Однако выигрыш свободной энергии при образовании внутримолекулярных водородных связей по сравнению с такими связями с молекулами H_2O незначителен. Роль воды в стабилизации глобулы иная.

Гидрофобный эффект есть единственная организующая сила, основанная на отталкивании растворителя, а не на взаимном притяжении элементов системы. Вода отталкивает неполярные молекулы, в частности, углеводороды — керосин или масло не смешиваются с водой.

В равновесном растворе или смеси химические потенциалы компонент равны. Для любых двух окружений a и b молекул данного вещества

$$\mu_{(a)} = \mu_{(b)} \tag{4.38}$$

или

$$\mu^0_{(a)} + RT \ln x_{(a)} = \mu^0_{(b)} + RT \ln x_{(b)}, \tag{4.39}$$

где $x_{(a)}$ и $x_{(b)}$ — молярные доли вещества в средах a и b, находящегося в равновесии, $RT \ln x$ характеризует энтропию смешения, μ^0 — унитарный химический потенциал, включающий свободную энергию всех молекулярных движений изолированного вещества и энергию специфических взаимодействий с окружающими молекулами. Представим себе систему, состоящую из неполярной жидкости, скажем, CCl_4, и воды. Так как CCl_4 не смешивается с водой, система расслаивается. Вводим в систему неполярное вещество, например, углеводород. Оно растворяется преимущественно в неполярном растворителе. В равновесии из (4.39) следует для углеводорода

$$\mu^0_{CCl_4} - \mu^0_{H_2O} = RT \ln \frac{x_{H_2O}}{x_{CCl_4}} < 0, \tag{4.40}$$

так как $x_{CCl_4} \gg x_{H_2O}$. Действительно, для углеводородов разности унитарных химических потенциалов (4.40) отрицательны и составляют примерно 3570 Дж/моль CH_2-групп и 8400 Дж/моль CH_3-групп. Гидрофобный эффект определяется свойствами воды — гидрофобные вещества безразличны к неполярным органическим растворителям.

Молекулы, содержащие как полярные, так и неполярные группы, располагаются таким образом, что первые группы контактируют с водой, а вторые удаляются из водного окружения. Ленгмюр показал, что так построены мономолекулярные слои жирных кислот на поверхности воды — полярные карбоксильные группы молекул погружены в воду, а неполярные углеводородные радикалы обращены наружу. Та же ситуация определяет структуру мицелл в водных коллоидных растворах мыл: гидрофобные группы располагаются внутри мицеллы, гидрофильные — на ее поверхности.

Физическая природа гидрофобных взаимодействий своеобразна. Плохая растворимость углеводородов в воде связана не с повышением энтальпии системы, а с уменьшением ее энтропии. Соответственно растворимость углеводорода в воде уменьшается, а не растет при нагревании. Энтальпия понижается также, но в общем балансе свободной энергии этот эффект перекрывается энтропийным. Так, при растворении бутана C_4H_{10} в воде при 298 К энтропия понижается на 96,6 Дж/(моль · К), а энтальпия — на 4200 Дж/моль. В результате свободная энергия возрастает на

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -4200 + 298 \cdot 97 \approx 33000 \text{ Дж/моль}. \quad (4.41)$$

Растворение углеводорода в воде можно трактовать как внедрение неполярных молекул в структурированные (льдоподобные) области воды и в более плотные неструктурированные области. В первом случае неполярные молекулы размещаются в пустотах рыхлой структуры, образуя *клатраты*, причем дополнительные контакты молекул с водой приводят к уменьшению энергии. Во втором случае увеличение числа контактов углеводород — вода приводит к уменьшению числа контактов вода — вода, которым отвечает более низкая энергия. В результате энтальпия увеличивается. Углеводороды лучше растворяются в структурированных областях и равновесие сдвигается в сторону увеличения структурированности (образование «айсбергов»), что означает понижение энтропии. Это — качественная картина. В целом «антипатия» углеводородов и воды определяется бо́льшим выигрышем свободной энергии при контактах вода — вода, чем при контактах углеводород — вода. Свободные энергии образования контактов двух жидкостей равны: октана с водой и октана с октаном 0,042 Дж/м^2, воды с водой 0,144 Дж/м^2.

Среди аминокислотных остатков белка имеются как полярные, так и неполярные, как гидрофобные, так и гидрофильные. Поскольку белковая цепь обладает некоторой гибкостью (благо-

даря наличию неупорядоченных участков), она может свернуться в глобулу так, чтобы гидрофобные остатки преимущественно контактировали друг с другом, а не с водой. Иными словами, центральная область глобулы, ее сердцевина должна быть гидрофобной («жирной»), а внешняя поверхность — гидрофильной («мыльной»).

Действительно, глобулярные белки денатурируются, т. е. переходят в неупорядоченное клубкообразное состояние, под действием слабополярных органических растворителей, образующих водородные связи хуже, чем вода. Действие этих растворителей определяется контактами с неполярными аминокислотными остатками белка и, тем самым, нарушением гидрофобных взаимодействий. Денатурирующее действие спиртов на белки возрастает с увеличением размеров алифатического радикала. Сильное денатурирующее действие мочевины также объясняется ослаблением гидрофобных взаимодействий.

Именно потому, что гидрофобные остатки «заталкиваются» внутрь глобулы, вода, окружающая белок, не подвергается добавочному структурированию. Конечно, молекулы H_2O взаимодействуют с полярными остатками на поверхности глобулы, но это взаимодействие имеет характер обычной сольватации.

Фишер дал грубую оценку влияния гидрофобных остатков на форму глобулы. Он разбил все аминокислотные остатки на две группы: полярные и гидрофильные (Арг, Асп, Гис, Глу, Лиз, Сер, Тир, Тре) и гидрофобные (остальные двенадцать). Считая, что все остатки имеют примерно одинаковые объемы и зная процентное содержание обоих типов остатков, можно найти форму глобулы. При заданном объеме наименьшую поверхность имеет сфера. Если число гидрофильных остатков достаточно для того, чтобы покрыть поверхность сферического гидрофобного ядра, то глобула имеет сферическую форму. Если это число больше, то глобула приобретает форму эллипсоида. Наконец, если гидрофильных остатков не хватает и они не могут закрыть ядро глобулы, то остаются незащищенные гидрофобные участки. При этом глобулы должны слипаться, образуя четвертичную структуру. Эти представления находятся в грубом соответствии с опытом.

Однако действительность, конечно, гораздо сложнее. Нельзя заменить 20 типов остатков, с их индивидуальными свойствами, всего лишь двумя типами. Следует говорить о степени гидрофобности остатка и ввести ее количественную меру. В качестве таковой Танфорд предложил изменение свободной энергии, ΔG, приходящееся на боковую группу (радикал R) свободной аминокислоты, при переносе ее из этанола в воду. В табл. 4.5 приведены относительные значения ΔG, экспериментально определенные Танфордом, причем ΔG для Гли принято за нуль, так как Гли не содержит бокового привеска.

Первые 10 остатков можно условно считать гидрофобными, вторые — гидрофильными. Эта классификация не совпадает с классификацией по полярности, т. е. по дипольным моментам.

Сильно полярный Арг имеет ту же гидрофобность, что и неполярный Ала, благодаря наличию большого углеводородного остатка.

Степени гидрофобности аминокислотных остатков дают информацию о стабилизации глобулы в водном окружении. Однако необходимо учитывать, что гидрофобные остатки могут фигурировать и на поверхности глобулы, если в цепи они соседствуют с

Таблица 4.5. **Гидрофобности аминокислотных остатков**

Остаток	ΔG, Дж/моль	Остаток	ΔG, Дж/моль	Остаток	ΔG, Дж/моль
1. Трп	12 600	8. Лиз	6300	15. Асп	2270
2. Иле	12 500	9. Гис	5900	16. Тре	1850
3. Тир	12 100	10. Мет	5500	17. Сер	170
4. Фен	11 100	11. Ала	3070	18. Гли	0
5. Про	10 900	12. Арг	3070	19. Асн	—40
6. Лей	10 200	13. Цис	2700	20. Глн	—420
7. Вал	7 100	14. Глу	2300		

гидрофильными. Необходимо рассматривать реальную структуру глобулы и весь баланс имеющихся в ней взаимодействий.

Гидрофобные взаимодействия имеют определяющее значение для структуры и свойств биологических мембран и мембранных белков (гл. 10).

§ 4.6. Связь между первичной и пространственной структурами белка

Построение биологических молекулярных и надмолекулярных структур всегда происходит в два этапа: *биосинтез* соответствующих больших и малых молекул и *самосборка* структуры. И биосинтез, и самосборка основаны на *молекулярном узнавании*, осуществляемом благодаря слабым взаимодействиям.

Применительно к белкам проблема самосборки является кардинальной. Генетически кодируется биосинтез (гл. 8), т. е. формирование первичной структуры белка. Однако биологически функциональна нативная пространственная структура белковой молекулы, возникающая в результате самосборки. Естественный отбор белков идет по пространственным — третичным и четвертичным — структурам. Молекулярная биология, молекулярная генетика не имели бы смысла, если бы между генетически предопределенной первичной структурой белка и его пространственным строением не было однозначного или вырожденного соответствия (см. § 7.1).

Наличие такого соответствия следует непосредственно из опытов по *ренатурации* белков (Анфинсен). В ряде случаев удалось наблюдать восстановление нативной структуры и функциональ-

ности денатурированного белка. При медленном «отжиге» белкового клубка происходит самосборка организованной глобулы.

Белковая цепь может иметь громадное число конформаций. Нахождение уникальной конформации, отвечающей абсолютному минимуму свободной энергии, путем перебора всех возможных конформаций невозможно. Эта задача, по-видимому, обходится и природой, так как такой перебор потребовал бы очень большого времени, а самосборка белковой глобулы происходит за время порядка 1 с. Основная идея современных работ, посвященных предсказанию структуры глобулы, исходя из знания первичной структуры цепи, состоит в том, что нативная глобула есть конечный результат самосборки, не обязательно отвечающий абсолютному минимуму свободной энергии. При нахождении нативной глобулы надо исходить из определенной иерархии структур. Белок может быть разделен на спиральные или вытянутые структурные сегменты, соединенные разнообразными изгибами или петлями. Два или три соседних по цепи структурных сегмента образуют элементарные комплексы: «*шпильки*» из антипараллельных α-спиралей, антипараллельные β-шпильки и параллельные β-шпильки, прикрытые α-спиралью. Далее возникает *домен*, т. е. компактная структура, построенная из нескольких соседних элементарных комплексов и структурных сегментов. Глобулы малых белков состоят из одного домена, больших — из нескольких. Эта иерархия структур показана схематически на рис. 4.14. Таким образом, предполагается блочный механизм сворачивания белка — более простые структуры нижнего иерархического уровня служат блоками для формирования высших структур (Птицын).

Проблема самосборки есть проблема физической динамики. Вторичная структура может служить блоком в самосборке, если, во-первых, она формируется значительно быстрее, чем третичная, во-вторых, если она существует достаточно долго и, в-третьих, если она достаточно велика и гидрофобна, чтобы включиться в сильное гидрофобное взаимодействие. И α-спирали, и β-формы удовлетворяют этим требованиям. Для расчета вторичной структуры необходимы параметры равновесия (величины s, с. 100) между различными возможными структурами для всех остатков. Соответствующий математический аппарат, использующий модель Изинга (с. 101), развит в работах Птицына и Финкельштейна. Гидрофобные остатки стабилизуют α- и β-формы, короткие гидрофильные, а также Гли и Про — дестабилизуют. Удается найти пространственную структуру ряда белков. Расхождение между вычисленным и наблюдаемым распределениями α- и β-участков не превышает 20% (рис. 4.15). Самосборка глобулы происходит двумя путями: формирование плоской β-структуры с последующим прилипанием к ней α-спирали и формирование β-шпильки или пары α-спиралей с последующим изломом. Распределение гидрофобных групп, благоприятствующее формированию α- или

β-участков, одновременно обеспечивает их способность встраиваться в глобулу.

Рассматривая корреляцию первичной и пространственной структуры белка, мы встречаемся с важной проблемой молекулярной биологии. В сущности речь идет о двух корреляциях —

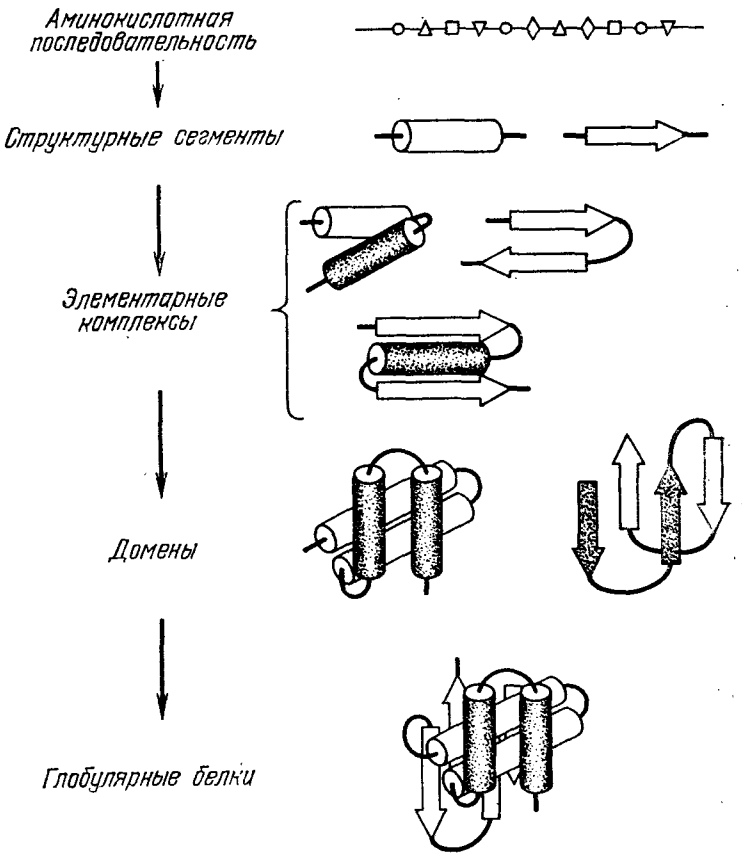


Рис. 4.14. Иерархия структур белка

наряду с указанной имеется соответствие пространственной структуры белка и его биологической функции.

Ряд данных свидетельствует о *вырожденности* обеих корреляций. Белки с разной первичной структурой могут иметь сходное пространственное строение, сходные или различные биологические функции. Это было показано, в частности, для глобинов — белков, содержащих группы гема, запасающих и переносящих молекулярный кислород. Первичные структуры глобинов значительно разнятся, но их пространственное строение весьма сходно — глобины, среди которых имеются миоглобины позвоночных

и леггемоглобин клубеньковых бактерий, содержат практически совпадающие α-спиральные участки и «карманы», в которые погружены группы гема (Леск и Чотиа).

Птицын показал, что белковая глобула может рассматриваться как «*отредактированный статистический сополимер*». Усреднение

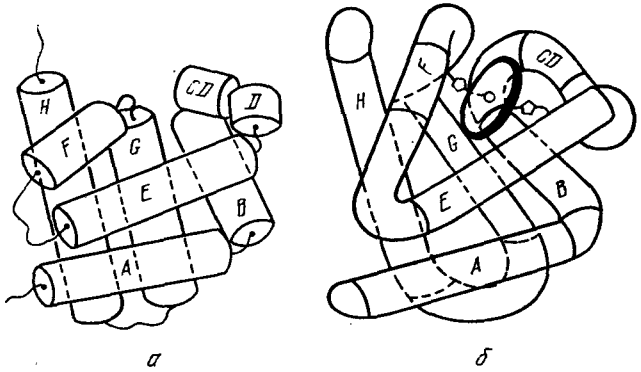


Рис. 4.15. Теоретическая модель миоглобина (*а*) и его действительное строение (*б*)

по первичным структурам белков практически не дает статистически достоверных отличий от случайного распределения для

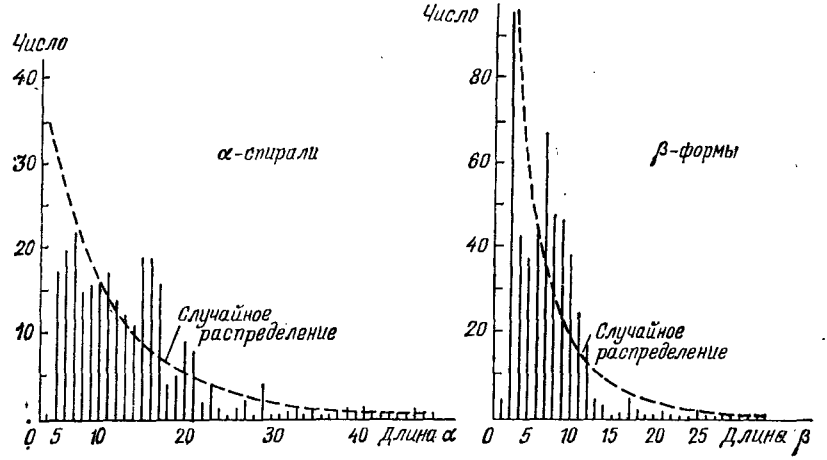


Рис. 4.16. Теоретические кривые (штриховые линии) и гистограммы, представляющие зависимость числа α-спиралей и β-форм от их длины в белках (Птицын)

аминокислотных остатков и их групп вдоль цепи. Это положение справедливо и для вторичной структуры. На рис. 4.16 показаны гистограммы для распределения длин α-спиралей и β-структур в 62 белках. Прерывистые кривые показывают распределения

длин неполярных кластеров в беспорядочных последовательностях, состоящих из равных чисел полярных и неполярных остатков, с непрерывными гидрофобными поверхностями в α-спиральных и β-структурных состояниях соответственно. Такое же хорошее согласие получается для α-, β- и βαβ-кластеров.

«Редактирование», происходящее в процессе эволюции, затрагивает биологически функциональную часть глобулы, ее активный центр. Активный центр белка-фермента включен в каркас, обладающий некоторой конформационной подвижностью. Точная структура каркаса не играет определяющей роли. Поэтому структура белка как целого мало связана с его функцией. Это создает важные возможности для белковой инженерии, для искусственного построения белков, применимых в биоэлектронике. Первые шаги в этом направлении уже сделаны. Так, синтезирован *Felix* — искусственный белок, содержащий четыре α-спирали (*Four helices*).

Приведенные факты имеют непосредственное отношение к биологической эволюции на молекулярном уровне, о которой пойдет речь в § 17.7. Забегая вперед, укажем, что вырождение соответствия первичной и пространственной структуры, равно как только что указанная статистичность, являются вескими свидетельствами в пользу *нейтралистской теории* молекулярной эволюции, развитой Кимурой.

§ 4.7. Структура и устойчивость глобулы

Пространственное строение и динамические свойства белковых глобул изучаются теоретически и при помощи ряда экспериментальных методов. Наиболее детальную информацию дает рентгеноструктурный анализ. Более простые методы оптики, оптической спектроскопии, спектроскопии ЯМР и ЭПР, а также γ-спектроскопии дают сведения о долях остатков, находящихся в α- и β-структурах, о внутриглобулярной подвижности и т. д. Эти методы охарактеризованы в следующей главе.

Косвенная информация о подвижности в глобуле может быть получена путем изучения *дейтерообмена* (обмена атомов H белка в тяжелой воде на атомы D). Более подвижные и менее прочно соединенные водородными связями атомы H легче обмениваются.

Поведение белка при денатурации, а также в ходе *протеолиза* определяется устойчивостью глобулы. Изучение денатурации проводится с помощью оптических и калориметрических методов. *Микрокалориметрия* — метод исследования суммарных свойств вещества, в частности, температурного хода теплоемкости.

Интересные сведения о структуре и динамических свойствах белков дает изучение скорости распространения *ультразвука* и его поглощения в водных растворах белков, а также белков в твердом состоянии. Применяется широкий диапазон частот — от 0,1 до 100 кГц. Такого рода исследования позволяют определять модули упругости глобулы (модуль Юнга имеет значение

2—9 ГН · м$^{-2}$), изучать межмолекулярные взаимодействия, гидратацию и денатурацию глобулы. Акустические методы с успехом применяются и при изучении нуклеиновых кислот.

В качестве примеров глобулярных белков рассмотрим миоглобин (Mb) и гемоглобин (Hb). Структура этих белков была детально исследована методами рентгенографии (Mb — Кендрью,

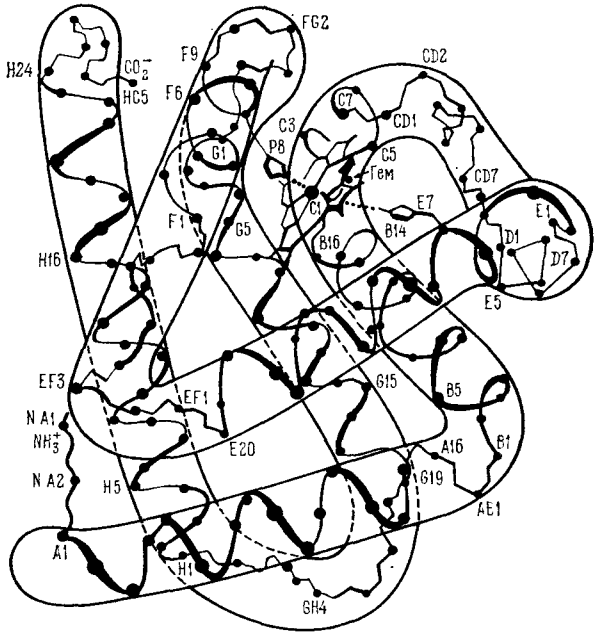


Рис. 4.17. Структура миоглобина

Hb — Перутц). На рис. 4.17 изображено строение Mb. Молекула, содержащая простетическую группу гема (указана стрелкой, ср. с. 50, 111), построена из восьми α-спиральных участков, прерываемых неупорядоченными. Примерно 75% общего числа 153 остатков принадлежит этим участкам, обозначаемым буквами от A до H (считая от N-конца цепи); внутри каждого α-спирального участка остатки нумеруются от 1 до n. Межспиральные, неупорядоченные участки обозначаются AB, CD и т. д., концевые участки — NA и HC—. В отличие от Mb, молекула Hb имеет четвертичную структуру: она состоит из четырех свернутых в глобулы цепей — двух цепей, обозначаемых α, и двух цепей β. Структура α- и β-глобул сходна, но не совпадает со структурой Mb.

Детальный анализ структуры Mb и Hb показывает, что «сердцевины» их глобул действительно заполнены плотно упакованными неполярными боковыми привесками R аминокислотных остатков. Число внутренних остатков в каждой из четырех субъединиц Hb равно 36. Многие остатки Гли и Ала, будучи слабо гидро-

фобными, располагаются на поверхности молекулы. Некоторые объемистые неполярные боковые цепи, не находящиеся внутри глобулы, спрятаны в выемке вблизи поверхности, что сводит к минимуму их контакты с водой. Все привески, ионизуемые при нейтральном pH, находятся на поверхности глобулы. То же справедливо для других полярных боковых цепей, за исключением связанных с гемом Гис и Тре С4, которые соединены водородной связью. В целом в Mb из 77 полярных групп только 5—6 расположены внутри глобулы, остальные находятся на ее поверхности. Изучение гемоглобинов различных видов позвоночных и миоглобинов кашалота и человека показало, что при замещениях 33 внутренних остатков сохраняется их неполярный характер. На поверхности глобулы имеется лишь 10 инвариантно неполярных остатков. Анализ α-спиральных участков A, B, E, G, H свидетельствует о периодическом расположении в них неполярных остатков. На одной стороне α-спирали расположены гидрофобные

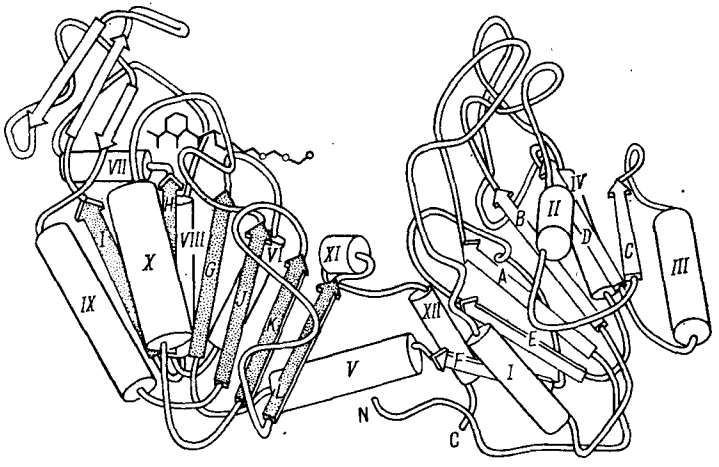


Рис. 4.18. Структура фосфоглицераткиназы

остатки, на другой — преимущественно гидрофильные. Гидрофобная сторона ориентирована к ядру глобулы.

Наиболее важная роль в эволюции принадлежит всего лишь пяти остаткам в нативном центре Hb. Именно замены этих остатков имеют эволюционное значение (Перутц).

Таким образом, гидрофобные взаимодействия особенно существенны при самосборке глобулы. Вторичная структура также определяется этими взаимодействиями.

Миоглобин и другие глобины не содержат раздельных областей — доменов — в глобуле. Многие белки имеют *доменную структуру*. На рис. 4.18 показано строение фермента фосфоглицераткиназы. Глобула состоит из двух доменов. Цилиндры *I—XII* — α-спирали, стрелы *A — L* — β-участки.

Взаимное расположение α-спиралей и β-лент в белковых глобулах имеет ограниченные топологические возможности. Левитт и Чотиа выделяют четыре основных типа. Во-первых, α-белки,

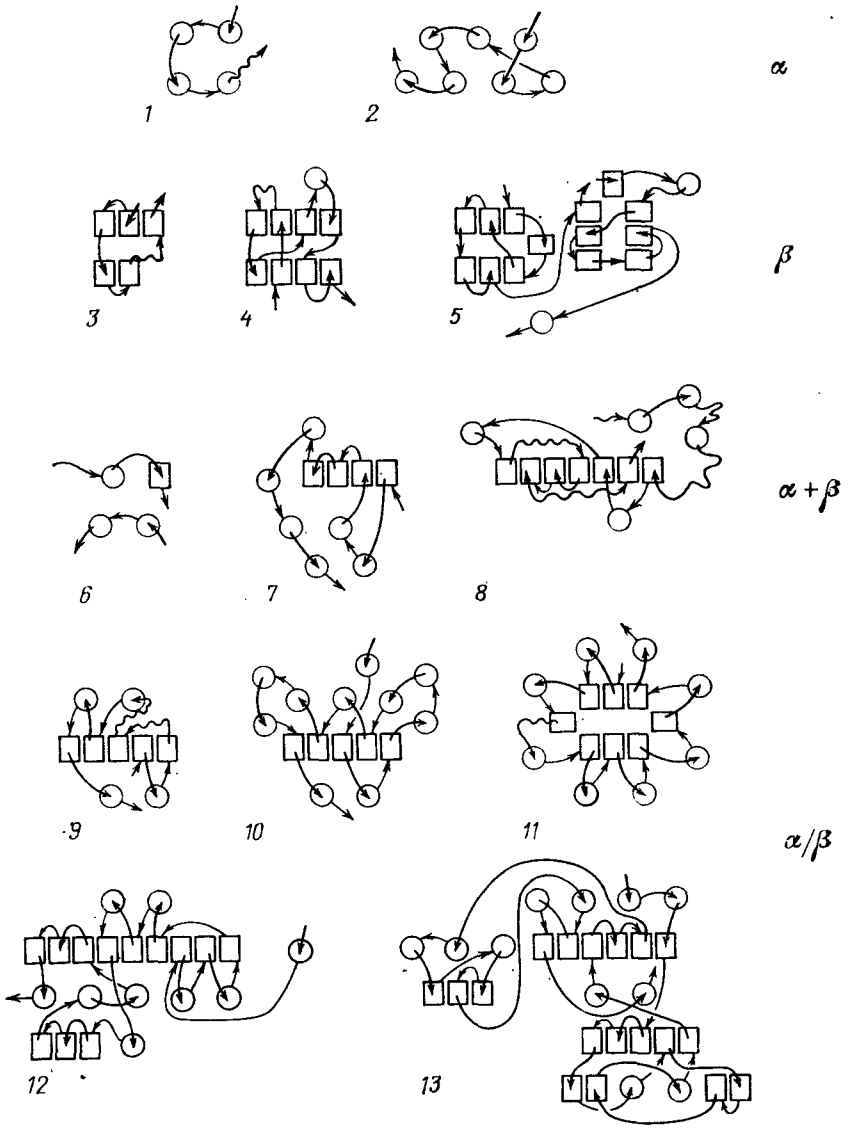


Рис. 4.19. Схемы строения белков

состоящие из α-спиралей, содержащие обычно два слоя таких элементов (глобины, гемэритрин). Во-вторых, β-белки, лишенные α-спиралей, содержащие обычно два β-слоя (рубредоксин, химо-

трипсин и др.). В-третьих, α + β-белки, в которых α- и β-участки перемешаны (рибонуклеаза, термолизин). Эти белки также обычно двухслойные. И в-четвертых, α/β-белки, в которых α- и β-участки отделены друг от друга. Чаще всего они имеют сэндвичевую αβα-структуру. На рис. 4.19 показаны схемы строения различных

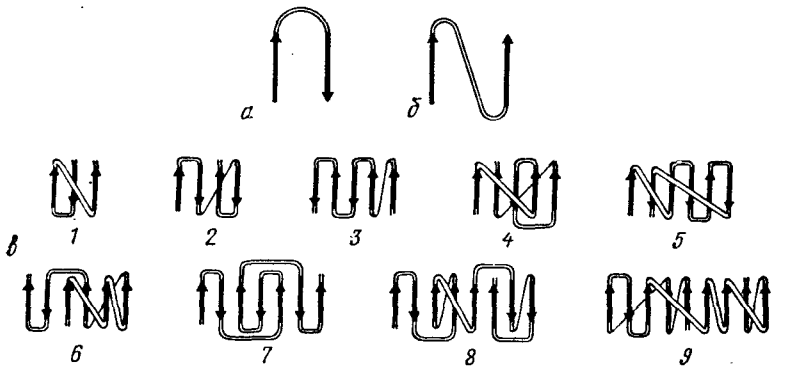


Рис. 4.20. Топология β-форм в белках

белков, отвечающие перечисленным вариантам (α-спирали показаны кружками, β-цепи — квадратами). Оси α-спиралей не обязательно параллельны друг другу. На рис. 4.20 показаны элементы β-структур: *а* — «шпилька», *б* — «параллельная шпилька», а также топологически различные их комбинации в глобулах (*в*). Ричардсон показала, что соответствующие геометрические мотивы подобны орнаментам на античных вазах.

Не только гидрофобные, но и электростатические солевые связи в белках стабилизуются водным окружением, так как при их образовании освобождаются ориентированные молекулы воды, окружающие заряженные группы. Тем самым возникновение солевой связи сопровождается увеличением энтропии воды. Этот выигрыш в свободной энергии более значителен, чем определяемый электростатическим притяжением зарядов. Однако воздействие воды на солевую связь отлично от гидрофобного — солевые связи усиливаются, а гидрофобные ослабляются при добавлении неводных растворителей.

Кажущаяся плотность белков в воде выше, чем их сухая плотность в органических растворителях. Это возрастание плотности вызывается *электрострикцией* связанной воды. Молекулы воды связываются на поверхности глобулы, а также внутри нее — между доменами химотрипсина, например, или между субъединицами белка, обладающего четвертичной структурой. Количество связанной воды, в которую не могут проникать электролиты, составляет около 0,3 г на 1 г белка, т. е. примерно 100 молекул H_2O на белок с м. м. 6000. Непроникновение электролитов в связанную воду определяется электростатическими эффектами. Рассмотрим заряд *е*, погруженный в растворитель с высокой диэлект-

рической проницаемостью ε_0, под которым расположен слой вещества с малой диэлектрической проницаемостью ε_p. В этом слое возникает индуцированный заряд, равный

$$e' = e\frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_p}{\varepsilon_0 + \varepsilon_p}. \qquad (4.42)$$

Соответственно энергия заряда e на расстоянии r от неполярного слоя равна

$$E = \frac{ee'}{2\varepsilon_0 r} = \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_p}{\varepsilon_0 + \varepsilon_p}\frac{e^2}{2\varepsilon_0 r}. \qquad (4.43)$$

Если $\varepsilon_0 = 81$, $\varepsilon_p \approx 5$, то $E = \kappa T$ при $r = 0{,}3$ нм, т. е. ионы не могут проникнуть в слой воды толщиною примерно в одну молекулу, находящийся на белке.

Разрушение нативной глобулы — денатурация белка — отлично от перехода глобула — клубок, описанного в § 3.5. Гетерополимерный статистический клубок является лишь конечным, отдаленным результатом денатурации. Белковая цепь сравнительно коротка, глобула не имеет флуктуирующей «опушки». Превращение такой глобулы в клубок должно быть фазовым переходом второго рода. Однако при термической денатурации белка наблюдаются разрывы, энтальпии и энтропии — ΔH и ΔS. Характерные значения для разностей ΔH и $T\Delta S$ порядка 400 кДж/моль.

Наблюдаемый с помощью сканирующей микрокалориметрии фазовый переход первого рода при денатурации является не переходом глобула — клубок (подобным переходу жидкость — газ), а переходом от нативной к «расплавленной» глобуле (подобным

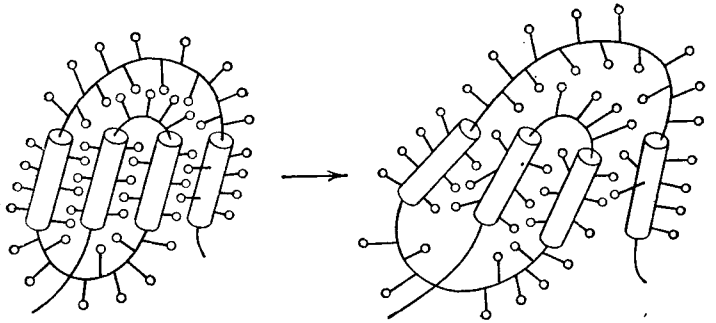


Рис. 4.21. Схема «плавления» белковой глобулы: слева — плотно упакованная глобула, справа — расплавленная глобула

переходу кристалл — жидкость). Схема такого перехода показана на рис. 4.21. Слабые связи разрушены, но глобула в целом сохраняется (Привалов, Птицын).

На рис. 4.22 показаны результаты спектроскопического изучения термической денатурации химотрипсиногена. При переходе

происходит изменение коэффициента поглощения света при 293 нм. Процесс обратим, кривые являются равновесными. Интервал перехода порядка 10°С.

Энтальпия и температура денатурации белка сильно зависят от pH среды, что свидетельствует о существенной роли электростатических эффектов. Так, например, миоглобин при pH 12,2

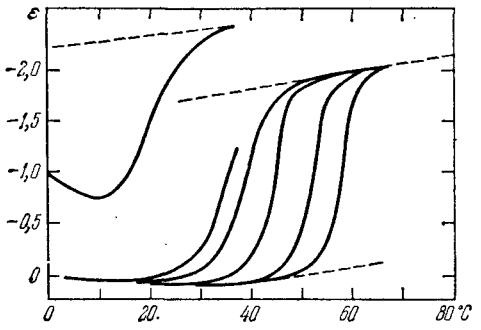


Рис. 4.22. Зависимость коэффициента экстинкции при 293 нм раствора химотрипсиногена от температуры. Кривые сняты при различных pH. Нижняя штриховая кривая отвечает нативной форме, верхняя — денатурированной

имеет $T_{пл} = 50°C$ и $\Delta H = 300$ кДж/моль; при pH 10,7 $T_{пл} = 78°C$ и $\Delta H = 710$ кДж/моль.

Денатурация белка кислотой или щелочью определяется двумя факторами. Во-первых, свободная энергия сферического полиэлектролита пропорциональна квадрату суммарного заряда поверхности, так что стабильность глобулы убывает в обе стороны от изоэлектрической точки. Во-вторых, изменение pH может приводить к ионизации групп, погребенных в неполярном ядре глобулы. Будучи ионизованными, эти группы притягивают гидратные оболочки, что вызывает сдвиг равновесия к расплавленной форме.

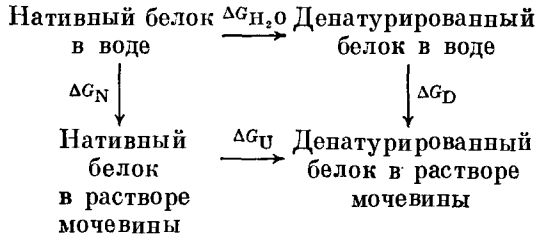
Сканирующая микрокалориметрия выявляет в ряде случаев последовательность пиков теплоемкости при плавлении глобулы. На рис. 4.23 приведена кривая плавления Лиз-плазминогена (Привалов и сотрудники). Ясно видны три пика теплоемкости. Это может свидетельствовать о раздельном плавлении доменов в глобуле или об отщеплении ионов H^+, происходящем при разных температурах в разных участках. В сочетании с рентгенографией и другими методами микрокалориметрия дает полезную информацию.

Остановимся на методе определения ΔG по денатурации в растворе мочевины (Танфорд). Имеем для этого процесса

$$-\Delta G_U = RT \ln K_U = RT \ln \frac{[D]}{[N]}, \qquad (4.44)$$

где [D] и [N] — концентрации денатурированного и нативного белков. Нас интересуют значения ΔG_{H_2O} для водного раствора.

Воспользуемся циклом



Тогда

$$\delta\Delta G = \Delta G_U - \Delta G_{H_2O} = \Delta G_D - \Delta G_N. \qquad (4.45)$$

Величину $\delta\Delta G$ можно представить в виде

$$\delta\Delta G = \sum y_i n_i \Delta G_i, \qquad (4.46)$$

где n_i — число групп типа i в белке, ΔG_i — их вклад в свободную энергию перехода, y_i — численный параметр, зависящий от степени доступности для растворителя групп данного типа в нативной конформации. Согласие с опытом получается, если принять

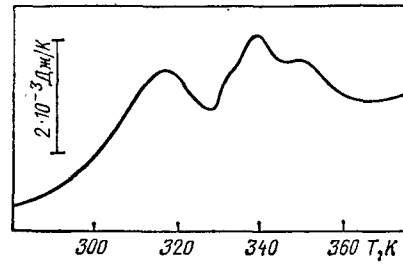


Рис. 4.23. Кривая плавления Лиз-плазминогена. По вертикальной оси — дифференциальная теплоемкость

для полярных групп $y_i = 0{,}25$, для гидрофобных $y_i = 0{,}75$, для пептидных связей $y_i = 0{,}50$. Величины ΔG_i находят из данных о растворимости аминокислот в воде и в растворе мочевины данной концентрации.

Пусть c_U^* — концентрация мочевины, при которой [D] = [N], т. е. точка полуденатурации. Тогда, согласно (4.44), $\Delta G_U = 0$ и

$$\Delta G_{H_2O} = -(\delta\Delta G)_{c_U^*} = -\sum_i y_i n_i (\Delta G_i)_{c_U^*}. \qquad (4.47)$$

Это удобный способ определения конформационной стабильности белка.

Свободная энергия денатурации должна быть суммой многих вкладов. Можно написать

$$\Delta G = \Delta G_\alpha + \Delta G_H + \Delta G_{нп} + \Delta G_e + \Delta G_{наб} + \Delta G_p + \ldots, \qquad (4.48)$$

где ΔG_α определяется переходами α-спираль — клубок, ΔG_H — разрывами водородных связей между белковыми цепями соседних макромолекул, $\Delta G_{нп}$ (нп — неполярные) — изменением гидрофоб-

ных взаимодействий, ΔG_e — изменением электростатических взаимодействий, $\Delta G_{наб}$ — набуханием образовавшегося клубка, $\Delta G_р$ — разрывом слабых связей между участками вторичной структуры. Имеем

$$\Delta G_\alpha = (N-4)\Delta H_\alpha - (N-1)T\Delta S_\alpha, \qquad (4.49)$$

где N — число звеньев в α-спирали, ΔH_α и ΔS_α — изменения энтальпии и энтропии на звено цепи с $N \gg 1$ при переходе спираль — клубок. Цепь из N звеньев имеет в α-спиральной форме $N-4$ водородных связей, ограничивающих подвижность $N-1$ звеньев. По имеющейся оценке $\Delta H_\alpha = 6{,}3$ кДж/моль, $\Delta S_\alpha = 17{,}6$ Дж/(моль · К). Если учесть лишь ΔG_α и $\Delta G_{наб}$, то температура перехода находится из условия $\Delta G = \Delta G_\alpha + \Delta G_{наб} = 0$, т. е.

$$T_{пл} = \frac{(N-4)\,\Delta H_\alpha + \Delta H_{наб}}{(N-1)\,\Delta S_\alpha + \Delta S_{наб}}, \qquad (4.50)$$

причем величиной $\Delta H_{наб}$ можно пренебречь; $\Delta S_{наб}$ пропорционально N — чем длиннее цепь, тем больше число поперечных связей. Оценка $\Delta G_{нп}$ дает 2,1 кДж/моль, значения $\Delta G_н$ и ΔG_e того же порядка. Строгое теоретическое определение всех вкладов в ΔG затруднительно.

Доля денатурированного материала может быть представлена формулой

$$x = \frac{\exp(-\Delta G/RT)}{1 + \exp(-\Delta G/RT)}. \qquad (4.51)$$

В точке перехода $\Delta G = 0$ и $x = 0{,}5$. Острота перехода характеризуется производной

$$\left(\frac{dx}{dT}\right)_{T_{пл}} = \frac{\Delta H}{4RT_{пл}^2}. \qquad (4.52)$$

Насонов и Александров (1940) предположили, что функционирование белков связано с их «частичной денатурацией». Позднее Александров установил корреляции между температурой тела организма и температурой денатурации его белков. Это иллюстрируется, в частности, табл. 4.6, в которой сопоставлены соответствующие характеристики двух родственных видов лягушек — более северной травяной лягушки (*Rana temporaria L.*) и более южной озерной лягушки (*Rana ridibunda Pall.*).

Температура денатурации белков значительно превосходит температуру тела. Александров объяснил эту корреляцию тем, что функционирование белка требует определенного уровня подвижности, внутренней гибкости глобулярной или фибриллярной белковой молекулы (о значении этой подвижности для ферментативного катализа см. в гл. 6). Чем ниже температура тела, тем

слабее должны быть внутримолекулярные взаимодействия, ответственные за жесткость молекулы, и тем ниже должна быть температура денатурации. Возможно, что здесь особенно важную роль играют междоменные взаимодействия в глобуле. По-видимому, существенны и электростатические взаимодействия — соляные мостики. Показательны свойства малого белка — *ферредоксина*, содержащего около 60 аминокислотных остатков и два кластера Fe_4S_4. Ферредоксин из бактерий *Clostridium pasterianum* полностью инактивируется при нагревании до 70°С в течение двух

Таблица 4.6. **Теплолюбивость лягушек (по Александрову)**

Характеристика	Травяная лягушка	Озерная лягушка
Граница ареала:		
северная	70° с. ш.	60° с. ш.
южная	43° с. ш.	40° с. ш.
верхняя	3048 м	2438 м
Температура тела в природе (°С)	6,0—26	11,0—29,5
Выбираемая температура	13—26	18—28
Температура потери рефлекторной возбудимости организма	30—32	35—36
Температура потери подвижности сперматозоидов	39,2	41,4
Температура потери способности к развитию яйцеклетки	36,6	38,5
Температура полной инактивации АТФ-азной активности мышечных гомогенатов	40—42	46—50
Температура 50%-ной денатурации гемоглобина	60	64
Температура 50%-ного сокращения коллагена сухожилий	51,5	57,6
Температура 50%-ной денатурации тропоколлагена кожи	25,5	32,0
Температура начала коагуляции сывороточного альбумина	68,0	75,0

часов, ферредоксин из *C. acidiurici* сохраняет при этом 20% активности, из *C. tartarivorum* — 50%, из *C. thermosaccharolyticum* — 90%. Выяснилось, что повышенная теплостойкость белка из термофильных организмов определяется добавочными солянными мостиками. Один такой мостик может увеличить свободную энергию стабилизации до 12—16 кДж/моль.

С денатурацией хорошо коррелирует протеолиз, т. е. гидролитическое расщепление белка с помощью протеолитических ферментов (Линдерштрем-Ланг). Чем выше термостабильность белка, тем труднее он расщепляется. Это важно, в частности, для лягушек — протеолиз коллагена коллагеназой происходит при утрате головастиком его хвоста.

§ 4.8. Антитела и антигены

Защита организма от чужеродных биополимеров и, тем самым, от инфекционных микроорганизмов осуществляется посредством *клеточного* и *гуморального иммунитета* (см. § 17.9). Во втором случае иммунитет определяется взаимодействием *антител* (АТ) — особых белков, производимых лимфатическими клетками,— с чужеродными биополимерами, именуемыми в этом случае *антигенами* (АГ). Иммунный ответ, т. е. появление антител в организме, есть результат узнавания антигенов определенными популяциями лимфоцитов. Процесс развивается на уровне организма, в нем участвуют различные клеточные узнающие системы, являющиеся «обучающимися», так как они приобретают *память* об однажды введенном антигене и отвечают на его вторичное введение усиленной выработкой антител.

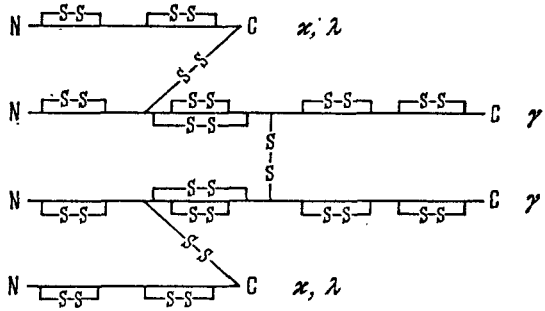
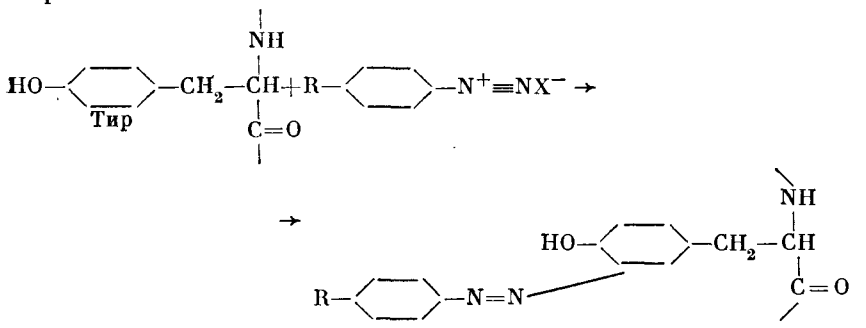


Рис. 4.24. Схема строения антитела IgG

АТ — это белки, относящиеся к иммуноглобулинам. У человека имеется пять основных классов иммуноглобулинов, обозначаемых IgG, IgM, IgA, IgD, IgE. В качестве АТ функционируют IgG. Их м. м. примерно 150 000, константа седиментации 7S. Иммуноглобулины IgM являются пентамерами IgG. Строение многих IgG изучено. На рис. 4.24 показана схема IgG кролика. Молекула состоит из двух тяжелых цепей с м. м. $53\,500 \pm 4000$ (~450 остатков), обозначаемых γ, и двух легких — с м. м. $23\,800 \pm 1000$ (~220 остатков), обозначаемых $\varkappa$ или λ. Цепи связаны дисульфидными мостиками.

АТ к самым различным АГ имеют сходное строение, несмотря на различия в первичной структуре, локализованные в вариабельной, V-области молекулы, лежащей вблизи N-концов легких и тяжелых цепей. По-видимому, АТ имеют доменную структуру, состоящую из нескольких глобул, соединенных друг с другом (рис. 4.25). V-области ответственны за взаимодействие АТ — АГ, поскольку специфичность АТ определяется особенностями первичной структуры. Активный центр АТ содержит V-область. В каждой молекуле АТ таких центров два.

АГ — прежде всего белки и полисахариды. Ландштейнер (1919) разработал метод получения искусственных АГ, основанный на соединении диазотированных ароматических веществ с Тир белка:



Таким образом, можно ввести в белок любой радикал R. R-фенилазобелок можно использовать в качестве АГ и стимулировать выработку соответствующих АТ.

Установлено, что фактором, определяющим антигенную специфичность, является именно радикал R, а белок играет второстепенную роль: АТ, полученное в ответ на R—Б (Б — белок), реагирует с R—Б′ (Б′ — другой белок), но не с R′—Б. Антиген R—Б дает с соответствующим АТ труднорастворимый осадок. Если добавить к системе R—АГ, АТ малые молекулы, содержащие ту же самую группу R, то реакция АГ с АТ тормозится, а при дальнейшем повышении концентрации прекращается. Малые молекулы не создают АТ в организме и не являются АГ. Однако они взаимодействуют с ранее возникшими АТ, образуя растворимые соединения. Это — так называемое гаптеновое действие, а указанные малые молекулы называются *гаптенами*. Гаптены конкурируют с АГ, взаимодействуя с теми же активными областями АТ. Реакция АТ с гаптеном или с АГ осуществляется посредством слабых взаимодействий, но подчиняется закону действия масс. Природные АГ поливалентны, т. е. они содержат несколько детерминантных (гаптеновых) групп. Для иммунологических процессов существенно пространственное строение детерминантной группы.

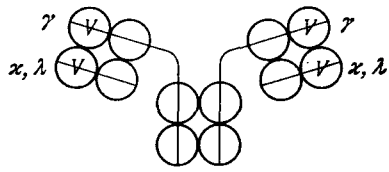
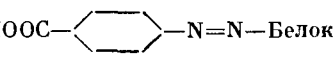
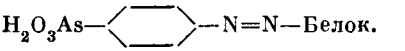


Рис. 4.25. Схема доменной структуры IgG по Эдельману

Наличие реактивных групп (активных центров) в АТ доказывается красивыми опытами Прессмана и Штернберга (1951). Кролик иммунизировался искусственными АГ, содержащими в качестве детерминантных групп остаток *п*-азобензойной кислоты



или *n*-азофениларсиновой кислоты



Полученные АТ подвергались йодированию, чем полностью подавлялась их иммунологическая активность. Однако если йодирование проводилось в присутствии гаптенов, то активность сохранялась. Очевидно, что введение йода в активную область АТ

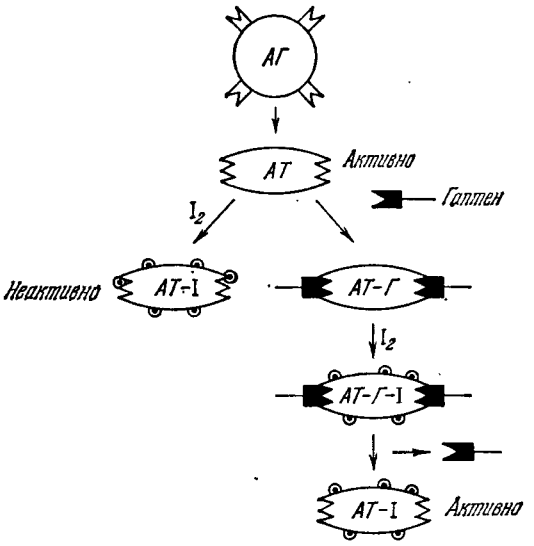
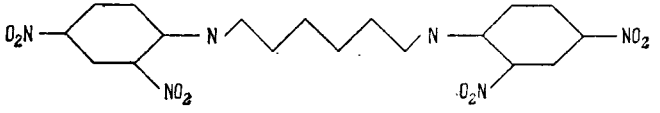


Рис. 4.26. Схема йодирования антител

уничтожает ее активность, а гаптен защищает эту область от йода. Сказанное изображено на рис. 4.26. Между активной областью АТ, с одной стороны, и гаптеном или детерминантной группой АГ, с другой, имеется структурное соответствие.

Методом электронной микроскопии была изучена структура комплекса АТ с соответствующим бифункциональным динитрофенильным гаптеном (ДНФ)



На рис. 4.27 показана электронная микрофотография комплекса АТ с ДНФ, а на рис. 4.28 — схема ее интерпретации. Двухвалентные АТ, взаимодействуя с двухвалентными же молекулами ДНФ, образуют тройные циклы. Выступы у вершин треугольников являются частями АТ, не содержащими вариабельных участков.

При предварительной обработке АТ пепсином эти части отщепляются (рис. 4.27, *б*).

Константы равновесия реакции АТ с АГ или гаптеном (Г) определяются в опытах *in vitro*:

$$K = \frac{[\text{АТ} - \text{Г}]}{[\text{АТ}][\text{Г}]} = \exp\left(-\frac{\Delta H - T\Delta S}{RT}\right). \qquad (4.53)$$

По зависимости K от $1/T$ определяются ΔH и ΔS. Изменения энтальпии порядка десятка кДж/моль (слабые взаимодействия),

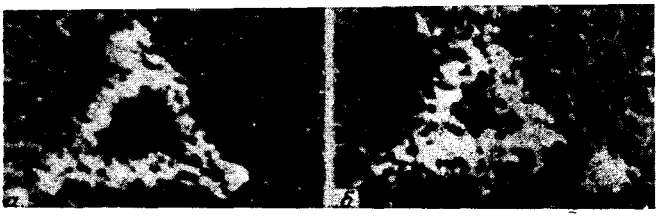


Рис. 4.27. Электронные микрофотографии комплекса АГ с АТ (*а*) и этого же комплекса, обработанного пепсином (*б*)

изменения ΔS, как правило, положительны, что можно объяснить освобождением гидратирующих молекул воды при образовании комплексов.

Исследования зависимости констант равновесия (связывания) от структуры Г или соответствующей детерминантной группы АГ были проведены Полингом и Прессманом (1944—1957). В частности, были получены АТ к ионам *орто-*, *мета-* и *пара*-азобензоларсоната. Антитела к каждой из этих групп действуют так, как если бы они вступали в структурное соответствие с ван-дер-ваальсовой поверхностью детерминантной группы. Зависимость взаимодействия от структуры проявляется очень ярко. Так, например, АТ к *орто*-азобензоларсонату хорошо связывает другие *орто*-замещенные (с радикалами OH, NO_2, Cl, CH_3, NH_2 вместо AsO_3H^-), слабее *мета*-замещенные и хуже всего *пара*-замещенные. Весьма важно относительное расположение частей гаптеновой группы. Для АТ к *пара*-—N=N—C_6H_4—AsO_3H^- относительные константы связывания гаптенов $OAsO_3H^-$, $H_3CAsO_3H^-$, $H_5C_6AsO_3H^-$ и $H_5C_6CH_2AsO_3H^-$ равны соответственно 0, 0, 1, 0. Удаление бензольного кольца (необходимого для связывания) от арсоната на одну группу CH_2 уничтожает связывание. Связывание сильно зависит от природы заряженной группы. Так,

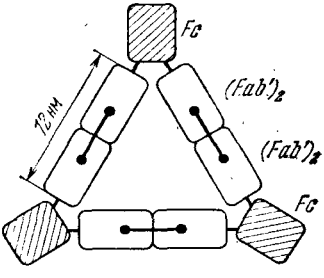


Рис. 4.28. Схема комплекса АГ с АТ. «Гантели» — молекулы ДНФ

те же АТ одинаково сильно связывают $C_6H_5AsO_3H^-$ и $C_6H_5PO_3H^-$, но не связывают $C_6H_5SO_3^-$, $C_6H_5CO_2^-$ и $C_6H_5SbO_5H_4^-$. Важны размеры иона.

Эти и другие данные свидетельствуют о комплементарности, о структурном соответствии активного участка АТ и детерминантной (или гаптеновой) группы АГ. Изучение взаимодействия АТ к поли-*L*-аланину с олигопептидами аланина позволило оценить размеры активного участка АТ: $2{,}5 \times 1{,}1 \times 0{,}2$ нм^3. Антитела — глобулярные белки. При денатурации АТ их способность к специфическому связыванию АГ или Г исчезает. В некоторых случаях удается осуществить ренатурацию антител с восстановлением их активности. Присутствие гаптена способствует ренатурации.

Молекулы АТ обладают некоторой гибкостью, т. е. способностью к конформационным превращениям. С помощью поляризованной люминесценции комплексов IgG с люминесцирующими красителями были установлены времена вращательной релаксации τ, оказавшиеся порядка 50 нс (см. § 5.5). Эти значения соответствуют броуновскому вращательному движению не всей молекулы белка, но малых ее участков, т. е. указывают на гибкость молекулы белка. По-видимому, домены обладают подвижностью. Взаимодействие гаптена с АТ приводит к заметному увеличению τ, что указывает на изменение конформации АТ. Было установлено, что при образовании комплекса АТ—АГ конформация АГ также меняется. Данные оптических измерений подтверждаются исследованиями спектров электронного парамагнитного резонанса антител, содержащих парамагнитные метки.

Когда в организм вводится АГ, в нем производится множество различных АТ. Каждое АТ синтезируется лишь одной определенной группой лимфоцитов и их производных — плазматических клеток (см. § 17.10). Милстейн и Келер (1975) разработали так называемую *гибридомную технику*, позволяющую выделять клон идентичных клеток, производящих определенные моноклональные АТ. Метод состоит в слиянии клеток миеломы — злокачественной опухоли иммунной системы с лимфоцитами, иммунизованными определенными АГ. Гибридные клетки — *гибридомы* — размножаются. Таким способом удается получать большие количества *моноклональных* АТ, широко применяемых в исследованиях, для диагностики, а также в терапии.

Модельная теория иммунитета изложена в § 17.10.

§ 4.9. Фибриллярные белки

В заключение этой главы остановимся на строении и свойствах фибриллярных белков — структурных и сократительных. Первые играют роль опорных и защитных компонент, входя в состав сухожилий, хрящей, костей, связок и т. д. (*коллагены*), а также кожи, волос, шерсти, рогов и т. д. (*кератины*). Вторые

являются рабочими веществами сократительных систем, в частности, мышц (*миозин*, *актин* и другие).

В отличие от большинства глобулярных белков, фибриллярные белки функционируют не в растворе, но образуют надмолекулярные системы. Они обладают свойствами жидких кристаллов.

Если соединительную ткань экстрагировать холодными растворами нейтральных солей при физиологическом значении ионной силы, то часть коллагена растворяется. Другая часть, именуемая *проколлагеном*, растворяется в лимонной или уксусной кислоте при pH 3,8.

Коллагеновые волокна (фибриллы) образуются при агрегации цепей проколлагена. Эти фибриллы играют роль центров кристаллизации при остеогенезе, росте костей.

Коллагеновые волокна нерастворимы в воде, но при длительном нагревании с водой в результате деструкции длинных белковых цепей коллаген превращается в растворимую желатину.

Аминокислотный состав коллагена своеобразен: 33% всех аминокислотных остатков составляет Гли, 12% — Про и 10% — неканонический остаток *оксипролил* (Опро). Этот остаток, а также *оксилизил* (Олиз), содержащийся в количестве от 0,3 до 1,2%, встречаются главным образом в коллагенах. Коллаген содержит также до 10% Ала и значительно меньшие количества других аминокислот, причем содержание Тир, Гис, Цис, Мет, Вал, Фен особенно мало́ — менее чем по 1%. Таким образом, до $^2/_3$ остатков составляют Гли, Про, Опро и Ала. Последовательность остатков в цепи коллагена можно представить в виде $(\text{Гли}-\text{X}-\text{X})_n$, где X — любой остаток. Чаще всего встречаются последовательности Гли — Про — Опро, Гли — Про — Ала, Гли — Ала — Опро.

Строение коллагена установлено в рентгенографических исследованиях Рамачандрана, Рича и Крика. Молекула коллагена в растворе, именуемая *тропоколлагеном*, построена в виде тройной спирали с м. м. около 360 000, каждая из трех цепей содержит около 1000 аминокислотных остатков. Длина молекулы 290 нм, диаметр 1,5 нм.

Теоретический расчет структуры тропоколлагена исходит из минимизации конформационной энергии и учитывает стабилизующую роль молекул воды (Туманян). Этот расчет дает результаты, согласующиеся с опытом. Тропоколлаген испытывает тепловой переход — денатурацию — в растворе. В зависимости от вида позвоночного температура денатурации $T_д$ меняется от 20 до 40°C, энтальпия денатурации — от 3150 до 6300 Дж/моль, энтропия — от 10,9 до 21 Дж/(моль · К) (калориметрические данные). Температура $T_д$, ΔH и ΔS возрастают с увеличением содержания иминокислотных остатков Про, Опро, которые не образуют внутримолекулярных водородных связей C=O····H—N. По-видимому, тропоколлаген действительно стабилизуется соседними молекулами воды, образующими водородные связи с иминными атомами азота: N····H—O. Удаление воды при-

водит к разрушению структуры коллагена, а ее последующее добавление эту структуру восстанавливает.

Нельзя считать до конца решенной проблему связи свойств коллагена с его строением. Работа в этой области необходима — коллаген является одним из важнейших белков и, обладая простым составом и строением, служит ценной моделью для изучения белков в целом.

Обратимся к *кератину*. Макроскопические свойства волос, шерсти и т. д. указывают на его высокую стабильность и нерастворимость. Эти особенности определяются прежде всего большим числом поперечных дисульфидных связей между полипептидными цепями. Кератин волос человека и кератин шерсти содержат 11—12% Цис, т. е. 3% серы.

Длина волокон кератина существенно зависит от содержания в них воды (на этом основан волосяной гигрометр). Эти волокна эластичны и поддаются растяжению. Первыми работами по рентгенографии белков были работы Астбюри, исследовавшего структуру кератина шерсти (1943). Для кератина нерастянутого волокна характерна периодичность 0,51 нм (α-кератин), при растяжении происходит переход в β-кератин с периодом вдоль оси волокна 0,33 нм и с поперечными периодами 0,47 и 0,97 нм. Астбюри считал, что α-кератину свойственны регулярные изгибы цепей, которые выпрямляются при растяжении. В дальнейшем было показано, что α-кератин состоит в значительной степени из α-спиралей, а β-кератин имеет каноническую β-форму.

Кератин — сложный белок. При разрыве дисульфидных связей в результате окисления или восстановления получается растворимое вещество, из которого можно выделить две фракции — бедную и богатую серой. Первая состоит из фибриллярных, вторая — из глобулярных молекул. Вероятно, глобулярные молекулы служат сшивками в кератиновых волокнах. Структурная единица волокна есть цилиндрическая микрофибрилла диаметром около 7,5 нм, построенная из белков с малым содержанием серы. На рис. 4.29 показана гипотетическая модель волокна α-кератина. Регулярно уложенные участки являются α-спиралями, скрученными попарно. Белок гетерогенен и состоит из двух главных компонент в отношении 2 : 1. Отдельные молекулы могут располагаться либо последовательно (рис. 4.29, *б*, *в*), либо параллельно друг другу (рис. 4.29, *г*). Опыт дает большие периоды вдоль волокна, равные 20 нм, что согласуется с моделями рис. 4,29, *в* и *г*, но не 4.29, *б*.

Микрофибрилла в целом состоит из 11 таких протофибрилл — двойных (а, может быть, и тройных) спиралей, причем две из них расположены в центре микрофибриллы, а девять — на ее периферии (рис. 4.29, *д*). Это отношение 9 : 2 характерно для ряда биологических фибриллярных структур (см. § 12.6).

Микрофибрилла имеет однородное строение. Длины спиральных участков, образующих протофибриллы, близки для разных видов, но состав неспиральных участков сильно варьирует. Раз-

личия в кератинах позвоночных определяются способом упаковки микрофибрилл и составом богатой серой глобулярной компоненты. Белок β-кератин изучен значительно хуже.

Упомянем еще об одном фибриллярном белке — о *фиброине* шелка. Он содержит главным образом Гли (более 40%), а также

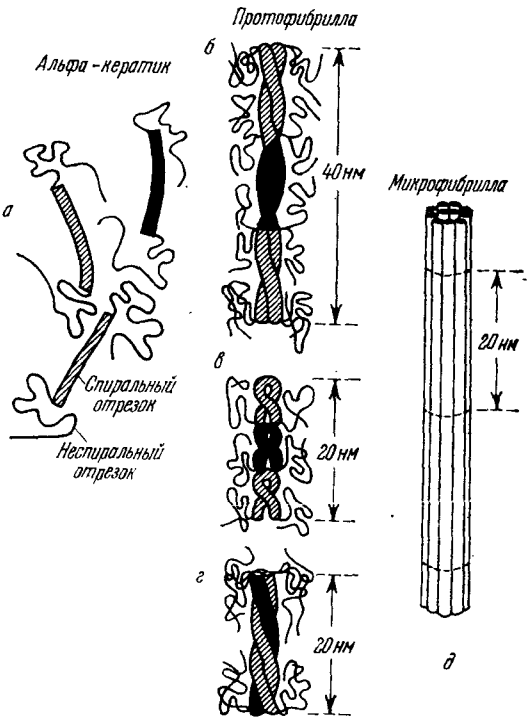


Рис. 4.29. Гипотетическая схема молекулярной организации α-кератина: *а* — отдельные молекулы двух основных компонентов (они зачернены и заштрихованы; последние — белки с низким содержанием серы); *б*, *в*, *г* — протофибриллы; *д* — микрофибрилла

Ала, Сер, Тир. Цис и Мет в его составе отсутствуют, остальные аминокислоты присутствуют в малых количествах. Рентгенограммы фиброина сходны с рентгенограммами β-кератина, основная конформация — β-форма. Шелк *Bombyx mori* образован полипептидом $(Гли — Ала)_n$, шелк *Lyssax* — полиаланином.

О сократительных белках рассказано в гл. 12.

Глава 5

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ БИОПОЛИМЕРОВ

§ 5.1. Рентгеноструктурный анализ

Прежде чем продолжить рассмотрение белков, остановимся на методах исследования структуры биополимеров.

Естествознание пользуется двумя главными способами для изучения строения атомов и молекул. Эти способы — химия и оптика в широком смысле слова, т. е. изучение взаимодействия вещества со светом во всем диапазоне длин волн — от рентгеновских лучей до радиоволн. Химия расшифровывает первичную структуру биополимеров, структуру функциональных центров белковых глобул и т. д. Однако химия как таковая не может установить пространственное строение белка или нуклеиновой кислоты.

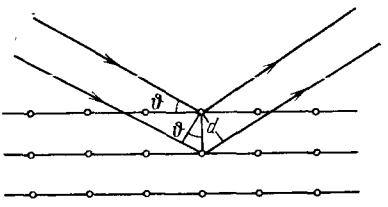


Рис. 5.1. Дифракция рентгеновских лучей

Рентгенография дает прямую информацию о расположении атомов в молекулах и кристаллах. Рентгеновские лучи, т. е. электромагнитные волны с длиной порядка 0,1 нм, рассеиваются на электронных оболочках атомов. Интерференция волн, рассеянных веществом, приводит к возникновению дифракционной картины. При рассеянии на кристалле можно рассматривать дифракцию как отражение рентгеновских лучей плоскостями кристаллической решетки (рис. 5.1). Дифракция наблюдается, если рассеянные волны находятся в фазе, т. е. разность хода равна целому числу n волн. Если расстояние между кристаллическими плоскостями равно d, то условие дифракции (отражения) дается *формулой Брэгга — Вульфа*

$$n\lambda = 2d \sin \vartheta, \qquad (5.1)$$

где λ — длина волны, ϑ — угол между направлением падающего луча и кристаллической плоскостью. Вывод формулы ясен из рис. 5.1.

Дифракция определяется тем, что межатомные расстояния d в решетке (0,1—0,4 нм) имеют тот же порядок, что и длины волн

(часто пользуются K_α-излучением Cu с $\lambda = 0{,}154$ нм). Основная идея рентгеноструктурного анализа состоит в определении расстояний d на основании дифракционной картины, получаемой для лучей с известной длиной волны. Подробные сведения о строении вещества можно получить только при исследовании кристаллов, в которых атомы расположены периодично. При этом, конечно,

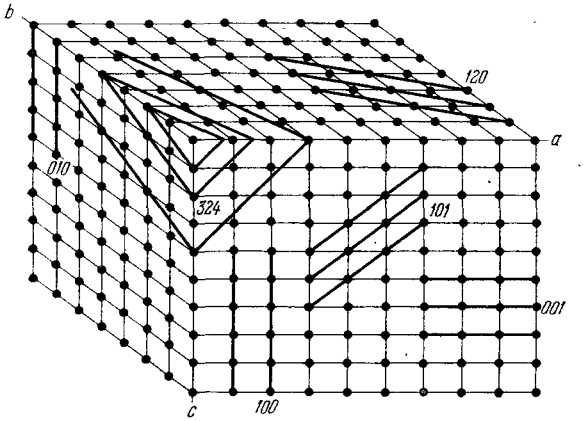


Рис. 5.2. Сечения отражающих плоскостей в ортогональной кристаллической решетке

элементарная формула (5.1) недостаточна. Кристаллическая решетка характеризуется не одним, а тремя периодами и в кристалле имеется набор различных кристаллических плоскостей, от которых «отражаются» рентгеновские лучи. Эти плоскости можно охарактеризовать целыми числами (*миллеровские индексы*) и межплоскостные расстояния d различны для разных индексов. На рис. 5.2 показаны сечения различных отражающих плоскостей в ортогональной кристаллической решетке. Соответственно на рентгенограмме (*лауэграмме*), полученной при монохроматическом излучении, наблюдается множество дифракционных максимумов. Их число особенно велико для кристаллов белка, что связано с относительно большими периодами кристаллической решетки. На рис. 5.3 показана рентгенограмма кристаллического миоглобина кашалота. Рентгенограмма получается на фотопленке, но ионизационные методы регистрации значительно более точны и чувствительны.

Дифракционные максимумы обладают различными интенсивностями. Их анализ позволяет найти распределение электронной плотности в кристалле. Эта плотность выражается через так называемые структурные амплитуды, зависящие от числа электронов в атоме и от направления рассеяния. Структурные амплитуды — величины комплексные, они характеризуются модулями и фазами. Не зная фаз, нельзя установить структуру объекта. Метод определения фаз, развитый Перутцом применительно к

белкам, состоит в том, что к молекулам, образующим кристалл, присоединяют тяжелые атомы, например, атомы ртути. Тяжелый атом, имеющий много электронов и сильно рассеивающий рентгеновские лучи, вызывает заметные изменения интенсивности дифракционных пятен. По разности амплитуд в присутствии и в отсутствие тяжелого атома можно определить фазу. Применение производных белка, содержащих несколько тяжелых атомов, позволяет решить проблему фаз однозначно. Необходимым условием при этом является полное сохранение структуры белкового кристалла при введении тяжелых атомов. Метод Перутца есть *метод изоморфного замещения* — ртутные производные белка кристаллизуются изоморфно с незамещенным белком.

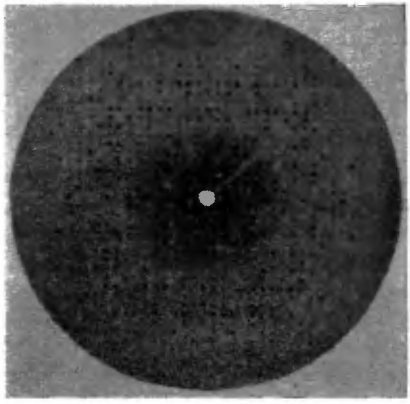


Рис. 5.3. Рентгенограмма миоглобина кашалота

Найденное по измеренным интенсивностям распределение электронной плотности $\rho(x, y, z)$ изображается своего рода «геодезическими картами», на которых линии соединяют точки с одинаковыми значениями ρ. Ввиду малости структурного фактора атомы водорода непосредственно не видны на карте электронной плотности. Их положение можно установить по искривлениям изолиний.

Пространственное распределение плотности можно сделать видимым, например, наложением друг на друга контурных карт, вычерченных на листах прозрачного пластика. Соответствующая картина для миоглобина показана на рис. 5.4. Окончательным результатом исследования является пространственная модель молекулы белка, в которой определены положения всех его атомов (см. с. 113, 185).

До сороковых годов рентгенография сравнительно простых низкомолекулярных соединений подтверждала их структуру, установленную химическими методами, и давала количественные сведения о межатомных расстояниях. В 1944 г. Ходжкин расшифровала структуру пенициллина, которую химикам не удавалось определить. Молекула пенициллина содержит 23 атома кроме атомов водорода. Далее Ходжкин установила структуру витамина B_{12}, определив координаты уже 93 атомов. Вслед за этим рентгенографию стали применять в исследованиях наиболее сложных молекулярных белков. Основоположником этого направления молекулярной биофизики был Бернал, крупнейшие достижения в изучении биополимеров принадлежат кембриджской научной школе (Брэгг, Кендрью, Перутц). В 1957 г. Кендрью ус-

тановил пространственное строение первого белка — миоглобина (с. 113), определив положения 2500 его атомов.

Необходимые для рентгеноструктурного анализа кристаллы белка далеко не всегда возможно вырастить. Они представляют собой молекулярные решетки, в узлах которых расположены глобулярные макромолекулы. Установлено, что денатурация этих молекул (переходы глобула — клубок) может предшествовать

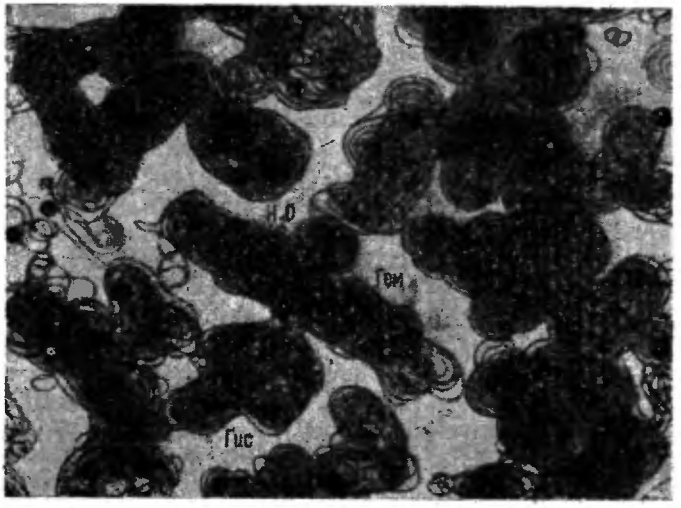


Рис. 5.4. Пространственное распределение электронной плотности в миоглобине

плавлению кристалла (Есипова и Макаров). Кристаллы белка содержат большое количество воды, и их исследуют в маточном растворе. Бернал и Ходжкин впервые воспользовались этим методом и получили десятки тысяч четких рефлексов на рентгенограммах. Их число может доходить и до сотен тысяч. Расшифровка столь сложных рентгенограмм — очень трудная и длительная работа, которую можно провести, лишь пользуясь ЭВМ. Для точного определения фазы, соответствующей каждому рефлексу, необходимо измерить несколько раз его интенсивность при дифракции как от чистого белка, так и от его производных, содержащих тяжелые атомы. В расчетах фигурируют десятки миллионов чисел.

В настоящее время рентгенография высокого разрешения (вплоть до 0,25 и даже 0,20 нм, для Mb — до 0,14 нм) проведена примерно для 200 глобулярных белков. Укажем, в частности, на расшифровку структур пепсина, леггемоглобина и аспартатаминотрансферазы (Андреева, Вайнштейн и Борисов). Исследован ряд ферментов, причем в некоторых случаях определено и

строение комплексов, образуемых ферментами с ингибиторами и с аналогами субстратов (см. гл. 6).

Принципиальная проблема, с которой встречается рентгенография белков, состоит в следующем: в какой мере структура белковой молекулы в кристалле совпадает с ее биологически функциональной структурой в водном растворе?

Если бы белковая глобула представляла собой не апериодический кристалл, а сильно флуктуирующее образование, то можно было бы думать, что кристаллизация означает отбор одной или нескольких конформаций из большого их числа в растворе. Но глобула имеет фиксированное строение. Кристаллические белки, как уже сказано, содержат большое количество воды, и их изучают в маточном растворе. Результаты рентгенографического исследования кристалла белка и данные оптических измерений того же белка в растворе, как правило, согласуются друг с другом. В частности, совпадают степени спиральности, определенные обоими методами. Более того, установлено, что ферментативная активность ряда белков сохраняется в сильно оводненном кристалле. В целом ответ на поставленный вопрос положителен (см., впрочем, следующий параграф). Напротив, белки, подвергнутые лиофильной сушке, изменяют свое строение — рентгенограммы высушенных кристаллов белка очень бедны рефлексами.

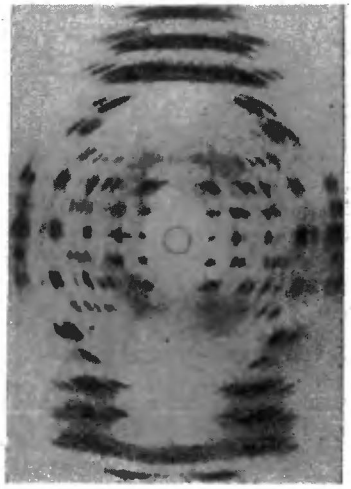


Рис. 5.5. Рентгенограмма Na-соли ДНК в форме *A*

Недавно с помощью особенно точной и тонкой методики удалось изучить температурную зависимость дифракции рентгеновских лучей на кристаллах белков (метмиоглобин, миоглобин, лизоцим) и определить подвижность аминокислотных остатков. Это важно для физики ферментов (см. § 6.4). Метод сводится к прецизионным измерениям интенсивности и ширины рефлексов, которая непосредственно связана с конформационной подвижностью аминокислотных остатков в белках и ее зависимостью от температуры. Это — метод *рентгенодинамического анализа*, обещающий очень многое.

Рентгенограммы фибриллярных биополимеров (коллаген, ДНК), образующих системы, периодические в одном измерении, характеризуются специфическими особенностями. На рис. 5.5 приведена рентгенограмма натриевой соли ДНК в так называемой *A*-форме (см. § 7.2). Для фибриллярной системы характерно растяжение дифракционных пятен в так называемые *слоевые линии*

и преимущественное их расположение вблизи меридиана или экватора рентгенограммы. Наблюдаемая картина представляет так называемую *осевую текстуру* одномерно упорядоченной системы, в которой одни оси молекулы приблизительно параллельны выделенному направлению, а другие оси ориентированы произвольно. Текстура имеет одну ось симметрии бесконечного порядка.

Для ряда биополимеров, в частности для ДНК, характерно спиральное строение. В этом случае на рентгенограмме текстуры наблюдается преимущественное расположение дифракционных пятен вдоль двух прямых, образующих косой (андреевский) крест (см. рис. 5.5). Не следует, однако, думать, что для расшифровки спиральной структуры достаточно простого обозрения рентгенограммы и констатации косого креста. Исследуемый объект представляет собой агрегат цепных молекул, обладающий гораздо меньшей упорядоченностью, чем трехмерный кристалл. Соответственно дифракционная картина бедна рефлексами. Разработан ряд приемов для ее расшифровки. Применяется метод «проб и ошибок»: на основании структурно-физических представлений и анализа атомных моделей строится пробная модель системы, для которой и вычисляется распределение интенсивностей рефлексов. Совпадение с наблюдаемым распределением доказывает истинность модели. Далее можно вычислить фазы и найти распределение электронной плотности биополимера. Именно таким способом была установлена знаменитая двойная спираль ДНК (см. § 7.2).

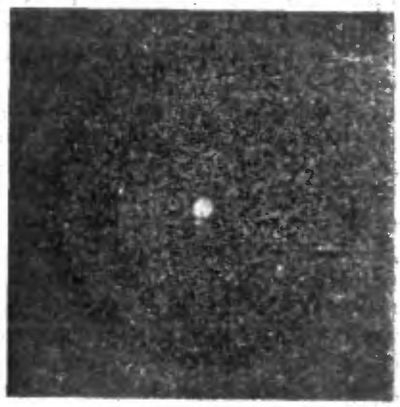


Рис. 5.6. Дебаеграмма коллагена

Агрегаты цепных молекул существуют в различных степенях упорядоченности, начиная с истинного кристалла и кончая аморфным полимером, в котором цепи разупорядочены. Строгая теория позволяет судить по дифракционной картине о нарушениях порядка, вызываемых сдвигами, изгибами, отклонениями от параллельной упаковки макромолекулярных цепей. Полимерные структуры в ряде случаев образуют *паракристаллы* — системы, лишенные истинного трехмерного порядка, но состоящие из цепных молекул, сдвинутых и повернутых параллельно друг другу. Для ряда фибриллярных белков (кератин, коллаген), для целлюлозы и некоторых других волокнистых веществ характерны нарушения упорядоченности с сохранением примерной параллельности осей молекул. Такие системы обладают свойствами *жидких кристаллов*.

Синтетические аморфные полимеры (например, каучук) дают, подобно жидкостям, дифракционные картины в виде совокупности концентрических колец (*диаграммы Дебая — Шерера*, рис. 5.6). Для такой картины, несравненно более бедной, чем лауэграмма кристалла, характерно наличие размытого кольца — *аморфного гало*, диаметр которого определяется преимущественными расстояниями между рассеивающими центрами. При растяжении аморфного полимера возникает текстура и вместо равномерных по интенсивности колец, как мы видим, наблюдаются более или менее протяженные дуги вблизи меридиана или экватора кольца. Сходные картины дают фибриллярные белки, а также надмолекулярные структуры типа мышечных волокон.

§ 5.2. Диффузное рассеяние рентгеновских лучей растворами биополимеров

Диффузное рассеяние рентгеновских лучей растворами макромолекул дает прямую информацию о распределении рассеивающих объектов. Диффузное рассеяние есть суммарное рассеяние на беспорядочно расположенных отдельных макромолекулах, тем самым в нем усредняются интенсивности рассеянного света по всевозможным ориентациям макромолекулы. Чем больше углы рассеяния, тем меньше размеры деталей структуры, на которых происходит дифракция рентгеновских лучей. Под малыми углами рассеянии изучается общее строение макромолекул в растворе, а под средними и большими — особенности их внутреннего строения.

Теория малоугловой дифракции исходит из представлений, близких к применяемым в теории рассеяния света растворами макромолекул (с. 82). Теория позволяет связать наблюдаемую под теми или иными углами интенсивность рассеяния, т. е. его индикатрису с расстояниями между рассеивающими частицами. Для определения формы макромолекулы приходится задаться некоторыми о ней предположениями — представить макромолекулу в виде шара, эллипсоида или вытянутого цилиндра. Для таких, а также для других простых тел вычисляется индикатриса рассеяния как функция геометрических параметров макромолекулы. Так, для шара определяется электронный радиус инерции (электронный, так как рентгеновские лучи рассеиваются электронами). Для миоглобина этот радиус оказался равным 1,6 нм, что хорошо согласуется с размерами, определенными методом рентгеноструктурного анализа кристаллического миоглобина. Если рассеивающая система вытянута, то определяется электронный радиус инерции ее поперечного сечения. По индикатрисам рассеяния определены размеры, форма и молекулярные массы ряда биополимеров. Так, лизоцим представляется эквивалентным эллипсоидом вращения с размерами $2{,}8 \times 2{,}8 \times 5{,}0$ нм^3. Более детальная информация о форме однородных частиц получается из анализа кривых рассеяния под большими углами (от

нескольких градусов до ~25° для Cu K_α-рентгеновских лучей). Рассеяние под большими углами характеризует детали размером от 4 до 0,5 нм.

На рис. 5.7 показаны теоретические индикатрисы рассеяния, вычисленные для различных моделей γG_1-иммуноглобулина, и экспериментальные точки, которые ложатся на теоретическую

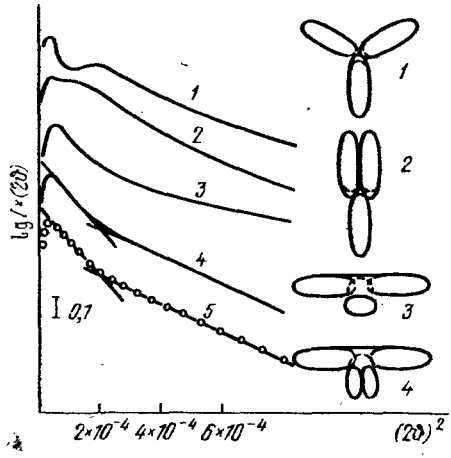


Рис. 5.7. Теоретические индикатрисы рассеяния для различных моделей иммуноглобулина (*1—4*) и экспериментальные точки (*5*)

кривую, отвечающую Т-образной модели расположения доменов (см. с. 123). Эта модель получила в дальнейшем полное подтверждение в кристаллографических исследованиях.

При расчете рассеяния необходимо учитывать влияние растворителей на вид индикатрисы. Это влияние не специфично и растворитель может быть заменен на однородный и бесструктурный континуум, характеризуемый лишь одним параметром — эффективной электронной плотностью.

Метод состоит в сравнении экспериментальной индикатрисы с теоретической, вычисленной на основе кристаллографических данных. Не обнаружено заметных различий между структурами в кристалле и растворе (в области расстояний $\geqslant 1$ нм) для рибонуклеазы и для комплексов рибонуклеазы и лизоцима с их ингибиторами. Однако экспериментальная кривая для лизоцима без ингибитора слегка отличается от теоретической в интервале расстояний ~ 2 нм. Это различие можно интерпретировать как флуктуационное расширение зазора между двумя доменами белка. Заметные различия обнаружены на кривых для миоглобина, что, по-видимому, объясняется флуктуационными смещениями ее GH-шпильки относительно других частей молекулы. Установлены также существенные различия в структурных данных для кристаллического и растворенного лизоцима фага Т4 и для других белков. Таким образом, по крайней мере некоторые белки в растворе характеризуются смещениями доменов, из которых построены глобулы.

§ 5.3. Методы ядерной физики

В качестве побочных выходов современной ядерной физики, пользующейся мощными пучками элементарных частиц — электронов, нейтронов и т. д., надо указать на рентгенографию, применяющую *синхротронное излучение*, и на *нейтронографию* кристаллических и растворенных биополимеров.

Магнитно-тормозное, или синхротронное, излучение (СИ) возникает при движении заряженных частиц, в частности, электронов в циклических ускорителях. В СИ происходит потеря энергии, затрачиваемой на ускорение частиц. СИ в рентгеновской области спектра имеет интенсивность на два порядка больше, чем современная рентгеновская трубка мощностью в 2 кВт. Применение специальной монохроматизации и коллимации позволяет повысить интенсивность рентгеновского СИ еще на два порядка, дальнейшее увеличение на 2—3 порядка достигается с помощью специальных накопителей. СИ характеризуется малой расходимостью пучка. Эти особенности позволяют воспользоваться СИ для рентгенографии быстро изменяющихся объектов.

Синхротронное излучение является весьма перспективным методом для исследования биологических процессов, связанных с конформационными и другими структурными превращениями на молекулярном и надмолекулярном уровнях.

Синхротронное излучение обеспечивает важные возможности рентгеновской спектроскопии. Рентгеновские кванты имеют энергию, как раз достаточную для ионизации внутренних электронов в атомах. На краю поглощения рентгеновских лучей наблюдается тонкая структура полосы поглощения. Эта структура есть результат отражения сферической волны, испускаемой первичным поглотителем (скажем, тяжелым атомом, расположенным в центре молекулы), от окружающих атомов и интерференции с рассеянными ими волнами. С помощью такого метода, именуемого EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure), удалось, например, получить ценную информацию о структуре *нитрогеназы* — белка, содержащего атомы молибдена.

Микрочастицы испытывают дифракцию, если длина де-бройлевской волны

$$\lambda = h/mv, \qquad (5.2)$$

где h — постоянная Планка, m — масса частицы и v — ее скорость, имеет тот же порядок величины, что и расстояние между деталями объекта.

Разнообразные применения нашла нейтронография.

Пучок нейтронов из атомного реактора подвергается монохроматизации отражением от кристаллической пластинки (например, CaF_2). Дифрагирующие нейтроны регистрируются счетчиками. Нейтроны рассеиваются не электронной оболочкой атома, но его ядром, и атомный фактор рассеяния определяется протонно-нейтронной структурой ядра, а не атомным номером. Поэтому атомные факторы изотопов существенно различаются. Атом-

ный фактор для водорода, т. е. для протона, далеко не минимален. Поэтому, в отличие от рентгенографии, нейтронография позволяет надежно локализовать атомы водорода. Так, например, с помощью нейтронографии была установлена детальная структура льда — показано, что каждый атом H, образующий ковалентную и водородную связи

$$O—H\cdots O$$

может иметь два положения — указанное и такое:

$$O\cdots H—O.$$

Иными словами, протон может находиться как у «своего», так и у «чужого» кислорода. Водородная связь в воде характеризуется перескоками протонов между двумя эквивалентными минимумами. Нейтронография успешно применялась в исследованиях биополимеров. Что касается диффузного рассеяния нейтронов растворами биополимеров, то оно дает результаты, существенно дополняющие получаемые при рассеянии рентгеновских лучей. Меняя долю тяжелой воды в водном растворе биологического объекта, можно варьировать суммарную амплитуду рассеяния нейтронов. При этом выявляется избирательное рассеяние различных функциональных групп. Удалось, в частности, исследовать природу комплексообразования белка и ДНК в хроматине.

Специфическим методом структурных исследований биополимеров является *γ-резонансная спектроскопия*, основанная на *эффекте Мёссбауэра*. Эффект состоит в резонансном поглощении атомным ядром монохроматического γ-излучения, испускаемого радиоактивным атомом. Во всех природных соединениях железа содержится 2,2% изотопа ^{57}Fe. Это дает возможность изучать Fe-содержащие белки (гемоглобин, миоглобин, цитохромы и т. д.) методом γ-резонанса. Образец подвергается действию γ-лучей, испускаемых радиоактивным ^{57}Fe (получаемым из ^{57}Co). Если сообщить источнику небольшую скорость движения относительно поглотителя, т. е. исследуемого образца, вдоль оси, соединяющей источник и образец, то частота γ-кванта немного изменится вследствие эффекта Доплера. При некотором значении собственной частоты ядра ^{57}Fe образца будут поглощать γ-кванты резонансно, переходя из основного в возбужденное состояние. Резонансная частота ядра ^{57}Fe в геме и в других Fe-содержащих группах весьма чувствительна к воздействию соседних атомов и групп. Это позволяет получать информацию об электронной структуре Fe-содержащих атомных групп в различных их состояниях в белках. Эффект может быть усилен обогащением биополимера изотопом ^{57}Fe. Для этой цели увеличивается содержание этого изотопа в пище подопытных животных, являющихся источником соответствующих веществ. Наряду с гемсодержащими белками методом γ-резонансной спектроскопии эффективно изучаются железосерные белки (ферредоксин, рубредоксин и т. д.), а также механизмы химических реакций с участием железосо-

держащих биополимеров. Можно использовать для структурных определений γ-излучающие изотопы в качестве меченых атомов и эффект Мёссбауэра как анализатор.

Наряду с абсорбционными γ-резонансными спектрами изучаются и эмиссионные. В этом случае источник содержит атомные ядра, материнские по отношению к мёссбауэровским. Эмиссионным методом изучено строение ряда порфириновых соединений кобальта — витамин B_{12} и др. Чувствительность эмиссионного метода очень велика, с его помощью удается следить за быстротекущими биологическими процессами.

Изучение белков, меченых ^{57}Fe, посредством этого метода показало, что подвижность их составных частей отлична от подвижности молекул в обычных кристаллах и жидкостях. О том же свидетельствуют исследования *рэлеевского рассеяния мёссбауэровского излучения* (Гольданский). Конформационная подвижность в белках сохраняется и при низких температурах.

Перспективы применения γ-резонанской спектроскопии связаны, во-первых, с созданием «мёссбауэрографии», т. е. рентгенографии на излучении мёссбауэровских ядер. Во-вторых, началась разработка γ-лазеров, что в принципе обещает возможность голографии на молекулярном уровне.

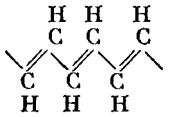
§ 5.4. Электронные спектры поглощения

В конечном счете все оптические и спектроскопические свойства молекул, дающие важнейшую информацию об их строении, определяются расстояниями между энергетическими уровнями молекулы и вероятностями перехода между ними. Эти уровни отвечают различным электронным, колебательным и вращательным состояниям молекул.

Электронные переходы полипептидных и полинуклеотидных цепей и, тем самым, белков и нуклеиновых кислот расположены в ультрафиолетовой области спектра. Полосы поглощения пептидной связи —CO—NH— лежат в области 185—240 нм, здесь же и в более коротковолновой области расположены полосы алифатических боковых цепей аминокислотных остатков. Ароматические остатки Трп, Фен, Тир имеют полосы поглощения в области 280 нм. Азотистые основания в нуклеиновых кислотах поглощают свет в области 260 нм. Таким образом, белки и нуклеиновые кислоты бесцветны, они не поглощают видимый свет.

Это вполне согласуется с диэлектрической природой биополимеров и делает мало правдоподобными утверждения об их электронной проводимости. Мы уже говорили о том, что для свободного перемещения электронов вдоль полимерной цепи она должна быть жесткой сопряженной системой, состоящей из чередующихся двойных и единичных связей или из сопряженных ароматических циклов. Гибкость цепи несовместима с ее электропроводностью. Короткие сопряженные цепи окрашены (каротин — красный, см. с. 49), а достаточно длинные поглощают весь

видимый свет, т. е. они черные или даже металлоподобные. Так, недавно был получен полимер ацетилена HC≡CH



обладающий металлическим блеском. Квантовомеханические расчеты действительно показывают, что для возбуждения электронов проводимости в белках необходима затрата очень большой энергии, не менее 3,5 эВ (т. е. 340 кДж/моль).

Некоторые кристаллические полупроводники бесцветны, но это не дает оснований считать биополимеры полупроводниками. По-видимому, малая электропроводность биополимеров объясняется присутствием трудно отделяемых ионов металлов и биологического значения не имеет.

Мономер белковой цепи подобен молекуле *амида* $R_1—CO—NH—R_2$. В результате изучения электронных спектров простых амидов (формамид, метилацетамид, миристамид) установлены электронные переходы в амидной группе (рис. 5.8). Схема электронных переходов основана на квантовомеханических расчетах. На рис. 5.9 показаны волновые функции амидной группы,

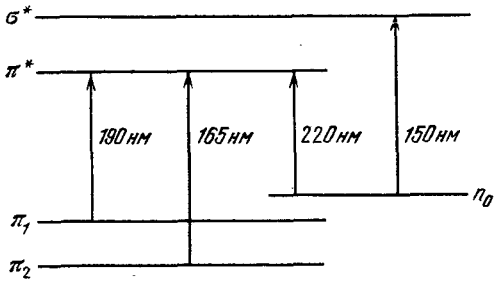


Рис. 5.8. Электронные переходы в амидной группе

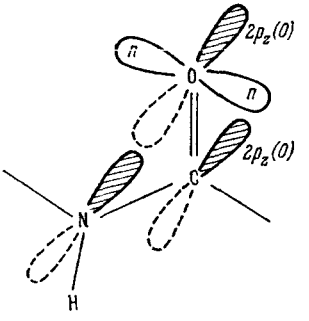


Рис. 5.9. Волновые функции амидной группы

соответствующие ее наиболее подвижным электронам. На рис. 5.8 уровень π_2 отвечает связывающей, уровень π^* — несвязывающей орбиталям C=O, уровень π_1 — несвязывающей орбитали азота, уровень n — состоянию неподеленной пары электронов атома кислорода. Переход $n\sigma^*$ — атомный электронный переход в кислороде.

Согласно *закону Бугера — Ламберта — Бэра*, интенсивность света, прошедшего через слой поглощающего вещества толщины l, равна

$$I = I_0 \exp(-\varepsilon c l), \qquad (5.3)$$

где I_0 — интенсивность падающего света, c — концентрация поглощающего вещества (в моль/л), ε — молярный коэффициент

поглощения (в л/(моль·см)). Поглощение в данной полосе, отвечающей переходу с начального уровня 0 на возбужденный уровень j, выражается так называемой *силой осциллятора* f_{0j}, определяемой интенсивностью полосы поглощения:

$$f_{0j} = 4{,}32 \cdot 10^{-9} \int \varepsilon_{0j} d\tilde{\nu}. \tag{5.4}$$

Здесь $\tilde{\nu}$ — волновое число, т. е. частота световой волны, деленная на скорость света; интегрирование проводится по всей полосе поглощения. Теория дает

$$f_{0j} = \frac{2m_e}{3\hbar e^2} \omega_{0j} p_{0j}^2, \tag{5.5}$$

где e и m_e — заряд и масса электрона, ω_{0j} — круговая частота, соответствующая переходу $0 \rightarrow j$:

$$\omega_{0j} = (E_j - E_0)/\hbar, \tag{5.6}$$

E_0, E_j — энергии основного и возбужденного состояний. Наконец, p_{0j} — матричный элемент дипольного момента, отвечающий переходу $0 \rightarrow j$, или *переходный дипольный момент*:

$$\mathrm{p}_{0j} = \int \psi_0 \mathrm{p} \psi_j^* d\tau. \tag{5.7}$$

Величина p_{0j}^2 называется *дипольной силой* перехода. Сила осциллятора есть величина безразмерная, ее значения для разных полос меняются от очень малых величин до порядка 0,1—1,0. Формула (5.7) показывает, что p_{0j}^2 и сила осциллятора тем больше, чем сильнее перекрываются волновые функции начального и конечного состояний ψ_0 и ψ_j. Переход $n\pi^*$ в амидной группе имеет малую дипольную силу, так как электронные облака n- и π^*-состояний почти перпендикулярны друг другу и слабо перекрываются (рис. 5.9).

Теоретические расчеты дают следующие длины волн λ_{0j}, соответствующие переходам: $n\pi^*$ 234, $\pi_1\pi^*$ 160, $\pi_2\pi^*$ 135 нм. В спектре миристамида наблюдаются полосы 220 ($n\pi^*$), 190 ($\pi_1\pi^*$) и 165 нм ($\pi_2\pi^*$). Переходный дипольный момент $\pi_1\pi^*$ лежит в плоскости HNCO под углом 9° к линии, соединяющей атомы O и N, а момент перехода $n\pi^*$ перпендикулярен к этой плоскости.

Спектры амидных групп в полимерной цепи изменяются вследствие электронного взаимодействия этих групп друг с другом. В частности, энергетические уровни для концевых групп цепи отличаются от уровней для внутренних групп. Наибольший интерес для биофизики представляют спектральные эффекты, возникающие вследствие экситонного резонансного взаимодействия, а именно *давыдовское расщепление* и *гипохромизм*.

Исследуя оптические свойства молекулярных кристаллов, Давыдов показал, что в регулярной совокупности тождественных хромофорных (светопоглощающих) групп между их возбужденными энергетическими уровнями может происходить резонансная

передача энергии возбуждения. В регулярной системе может распространяться волна возбуждения — *экситон* (Френкель). В результате резонансного взаимодействия энергетические уровни расщепляются, образуя широкую зону. Правила отбора разрешают переходы при поглощении и испускании света не на любые,

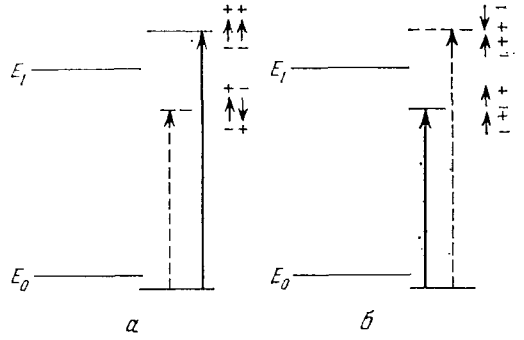


Рис. 5.10. Уровни энергии для системы параллельных (*а*) и коллинеарных (*б*) дипольных моментов перехода

но на строго определенные уровни зоны, причем поляризация полос поглощения определяется симметрией регулярной системы как целого.

Резонансное взаимодействие возможно уже в димере, и в нем оно приводит к расщеплению исходного уровня на два. На рис. 5.10 показана схема такого расщепления для случаев параллельного и коллинеарного расположения переходных диполей. Сплошные стрелки указывают разрешенные переходы, прерывистые — запрещенные. Моффит провел теоретический расчет экситонного расщепления для перехода π,π^* 190 нм в α-спирали. Согласно теории Давыдова, эта полоса расщепляется на две, причем одна из полос поляризована вдоль оси спирали, а вторая — перпендикулярно к ней. Разность частот двух полос составляет 2700 $см^{-1}$ (или ~10 нм в шкале длин волн).

Резонансное взаимодействие приводит к перераспределению интенсивностей спектральных полос. В случае двух коллинеарных переходных диполей полоса с меньшей частотой (с большей длиной волны) увеличивает свою интенсивность за счет интенсивности коротковолновой полосы. Возникает гиперхромизм в длинноволновой полосе. Напротив, в случае параллельных дипольных моментов понижается интенсивность длинноволновой полосы и увеличивается интенсивность коротковолновой. Возникает гипохромизм длинноволновой полосы. Именно гипохромизм наблюдается в спектрах α-спиральных полипептидов и белков, а также двуспиральных нуклеиновых кислот. Если дипольные моменты перпендикулярны друг другу, то перераспределения интенсивности нет.

На рис. 5.11 показаны экспериментальные результаты, полученные для полиглутаминовой кислоты (ПГК). При pH 4,9 полимер находится в форме α-спирали, при pH 8,0 — в форме клуб-

ка. Хорошо наблюдаются две полосы, возникшие в результате давыдовского расщепления, и сильный гипохромизм.

Сила осциллятора длинноволновой полосы α-спирали понижена на 30%. В форме клубка длинноволновые полосы ПГК и полилизина характеризуются силой осциллятора 0,110, в α-спиральной форме — 0,075.

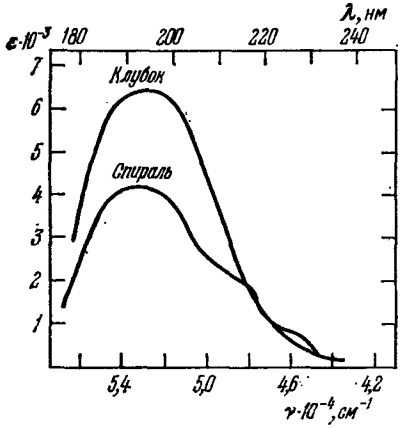


Рис. 5.11. Спектр поглощения ПГК

Гипохромный эффект был детально изучен и экспериментально, и теоретически. Исследована зависимость эффекта от окружающей среды, от pH и ионной силы.

Очевидно, что исчезновение гипохромизма при переходе спираль — клубок может дать количественную меру α-спиральности белка. Ввиду трудностей, с которыми сопряжены спектрофотометрические измерения в далекой ультрафиолетовой области вблизи 200 нм, этот метод малоупотребителен при изучении белков. Напротив, он прост и эффективен для нуклеиновых кислот, длинноволновые полосы которых лежат вблизи 260 нм.

§ 5.5. Люминесценция

Подобно спектрам поглощения, спектры люминесценции (флуоресценции) сложных молекул размыты и лишены тонких деталей. Информативными оказываются не столько длины волн максимумов полос, сколько интенсивность, поляризация и длительность свечения.

Допустим, что в момент $t = 0$ имеется $n(0)$ возбужденных молекул. Если вероятность перехода за 1 с из возбужденного состояния в невозбужденное с излучением кванта света есть f, а вероятность безызлучательного перехода, в котором энергия возбуждения превращается в тепло, есть g, то

$$dn = -(f+g)\,n\,dt \tag{5.8}$$

и

$$n(t) = n(0)\exp[-(f+g)t]. \tag{5.9}$$

Средняя длительность возбужденного состояния

$$\tau = \int_{t=0}^{\infty} t\,dn \Big/ \int_{t=0}^{\infty} dn = \frac{1}{f+g}. \tag{5.10}$$

Интенсивность флуоресценции убывает экспоненциально. В большинстве случаев τ равно по порядку величины $10^{-8} - 10^{-9}$ с, но может быть и гораздо больше.

Квантовый выход выражается долей переходов с излучением

$$\gamma = f/(f+g). \tag{5.11}$$

В растворе равновесное распределение молекул по их запасам колебательной энергии не зависит от избытка этой энергии, полученной при возбуждении и, следовательно, от длины волны $\lambda_{возб}$ возбуждающего света. Значит, τ и γ также не зависят от $\lambda_{возб}$ (*закон Вавилова*).

Флуоресцентное излучение сложных молекул (в частности красителей) полярнзовано даже при естественном падающем свете. Теория поляризации люминесценции разработана Вавиловым и Феофиловым. Возбуждающий свет поглощается молекулами, определенным образом ориентированными по отношению к электрическому вектору световой волны. После поглощения энергия излучается в результате другого электронного перехода, которому отвечает, вообще говоря, иная поляризация в молекуле, т. е. иное направление переходного диполя. Если время жизни возбужденного состояния, т. е. время передачи энергии, мало́ по сравнению с временем переориентации молекулы, то люминесценция поляризована. *Степень поляризации* выражается величиной

$$P = \frac{I_z - I_x}{I_z + I_x}, \tag{5.12}$$

где I_z и I_x — интенсивности излучения с составляющими электрического вектора вдоль осей z и x при направлении падающего света вдоль оси y (рис. 5.12). Расчет показывает, что предельное значение P при естественном падающем свете для неподвижных произвольно ориентированных молекул равно $^1/_3$. Вращательное движение молекул или атомных групп деполяризует свечение. Теория дает *формулу Левшина — Перрена*

$$\frac{1}{P} = \frac{1}{P_0} + \left(\frac{1}{P_0} + \frac{1}{3}\right)\frac{kT}{V\eta}\tau. \tag{5.13}$$

Здесь P — наблюдаемая степень поляризации; P_0 — ее предельное значение в отсутствие деполяризации, т. е. при $T \to 0$, или при вязкости среды $\eta \to \infty$; V — объем молекулы, τ — время жизни возбужденного состояния. Степень поляризации убывает с увеличением подвижности излучающей молекулы и может служить мерой подвижности.

Безызлучательные переходы, благодаря которым квантовый выход γ меньше 1, сводятся к превращению световой энергии в тепло. Молекула, возбужденная фотоном $\hbar\omega_a$ до некоторого синглетного уровня E_{S1}, может с вероятностью f излучить квант $\hbar\omega_f$; в ней может произойти внутренняя конверсия энергии в колебания с сопутствующей деградацией в тепло; молекула может пе-

рейти без излучения на метастабильный триплетный уровень E_{T_0}, растрачивая часть энергии возбуждения. В дальнейшем энергия E_{T_0} может выделиться в виде фотона фосфоресценции $\hbar\omega_{ph}$ или деградировать в тепло. Все эти процессы представлены на рис. 5.13.

Другая важная причина уменьшения квантового выхода — *тушение люминесценции*. Оно может вызываться посторонними веществами или миграцией энергии возбуждения от молекулы к

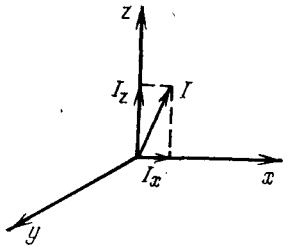


Рис. 5.12. Схема, поясняющая поляризацию люминесценции

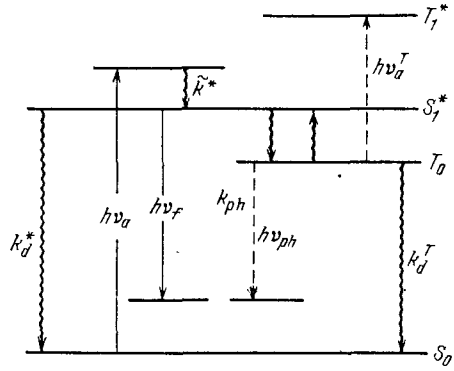


Рис. 5.13. Схема энергетических переходов при люминесценции

молекуле (концентрационное тушение). Речь идет не об излучении с последующей реабсорбцией света, но о прямой передаче энергии возбуждения вследствие резонансного взаимодействия молекул, которое растет с уменьшением расстояний между молекулами, т. е. с увеличением концентрации. Условием такого взаимодействия является сильное перекрывание полос поглощения и испускания молекул.

Различие между резонансным и экситонным (с. 143) взаимодействиями количественное. Резонансная миграция энергии происходит, если энергия взаимодействия велика, т. е. сильно превышает ширину электронно-колебательной зоны. В этом случае передача энергии происходит быстро и можно не учитывать влияния колебаний. В отличие от экситонных спектров, возникающих при слабом взаимодействии (энергия которого значительно меньше ширины зоны), в спектрах резонансно взаимодействующих молекул не наблюдается колебательной структуры.

Миграция энергии вызывает деполяризацию люминесценции. Молекула, поглощающая квант, как-то ориентирована в пространстве. Если бы та же молекула излучала свет, то он обладал бы некоторым значением степени поляризации P. Однако за время τ, протекающее между поглощением и излучением, возможны многократные акты передачи энергии другим молекулам с несколько отличными ориентациями. По прошествии определенного времени все возбужденные молекулы теряют первоначальную ориентацию и излучение оказывается деполяризованным.

Нужно подчеркнуть, что миграция энергии возможна как между тождественными, так и между разными молекулами при условии перекрывания полосы поглощения молекул одного сорта и полосы флуоресценции молекул другого сорта.

Изучение особенностей люминесценции, связанных с миграцией энергии, важно для биофизики. Передача энергии с одного

Таблица 5.1. **Спектральные свойства ароматических аминокислот**

Аминокислота	λ_{max}, нм (поглощение)	ε, моль$^{-1}$·л$^{-1}$	λ_{max}, нм (флуоресценция)	γ
Фенилаланин	257	200	282	0,04
Тирозин	257	1300	303—304	0,21
Триптофан	280	5600	353	0,21

люминесцирующего участка биополимера на другой позволяет оценить их относительное расположение. Изучение поляризованной люминесценции дает информацию о конформационной структуре и ее динамике — о подвижности макромолекулы и отдельных ее групп. Люминофорами часто являются циклические π-электронные системы. Так, светятся ароматические аминокислотные остатки в белках. Спектральные свойства соответствующих аминокислот указаны в табл. 5.1.

Флуоресценция Фен практически не видна. Свечение Тир и Трп существенно зависит от pH и полярности среды, от протонизации соседних групп. В нативных белках γ для Тир значительно меньше 0,21; напротив, γ для Трп может увеличиваться до 0,32. Денатурация мочевиной делает равными значения γ Тир и Трп — их квантовые выходы конформационно чувствительны. Дело в том, что тушение люминесценции Тир и Трп зависит от окружения, в частности, от его гидрофобности. Свечение остатков, переходящих при конформационных изменениях из ядра глобулы на ее поверхность, легче тушится и посторонними тушителями. Изучение люминесценции белков (ароматических остатков) дало ценные сведения об их конформационных свойствах и взаимодействиях с другими молекулами и ионами.

Не менее ценные результаты дает применение люминесцентных меток. Конформационная структура и динамика комплексов нуклеиновых кислот с люминофорами — с акридиновыми красителями — успешно изучаются с помощью поляризованной люминесценции.

С люминесценцией прямо или косвенно связаны три направления биофизических исследований, о которых необходимо сделать критические замечания.

1. Представления о миграции энергии, возникшие в результате изучения люминесценции, легли в основу попыток объяснения ряда биологических процессов. Многие из этих процессов протекают быстро, по принципу «все или ничего». Истинное объясне-

ние таких явлений должно, по-видимому, исходить из их кооперативной природы. Применительно ко многим задачам такое объяснение получено. Однако в литературе фигурируют соображения о миграции энергии в биополимере или в окружающей его якобы «структурированной» воде. На этой основе пытались, например, истолковать мышечное сокращение. «Миграционные» представления в «темновой» биологии не имеют оснований.

2. В 1923 г. Гурвич сообщил об открытии *митогенетических лучей*, испускаемых клетками при их митотическом делении и, в свою очередь, стимулирующих митозы. Продолжавшиеся в течение ряда лет попытки обнаружить это излучение точными физическими методами не привели к успеху. Существование митогенетических лучей не подтвердилось, их изучение поэтому давно оставлено. Равным образом ложны сообщения об ультрафиолетовых излучениях при гибели клеток и при иных биологических процессах.

3. Клетки и ткани растений и животных обладают зачастую на воздухе слабым свечением, которому приписывалось биологическое значение. Однако это свечение — *хемилюминесценция*, определяемая, в основном, окислением липидов. Многие органические соединения светятся при окислении. Биологического значения это свечение, по-видимому, не имеет. Оно может использоваться как индикатор окислительных процессов.

§ 5.6. Естественная оптическая активность

Как уже говорилось, биополимеры хиральны и, следовательно, обладают естественной оптической активностью, т. е. вращают плоскость поляризации света, и *круговым дихроизмом* (см. далее).

Оптическая активность — способность хиральной среды поворачивать плоскость поляризации проходящего света — была от-

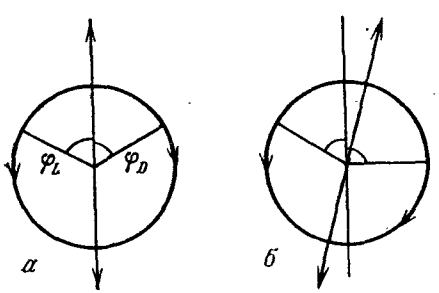


Рис. 5.14. Разложение плоскополяризованной волны на волны, поляризованные по кругу вправо и влево (*а*), и поворот плоскости поляризации в результате кругового двулучепреломления (*б*)

крыта Араго в 1811 г. Как показал Френель (1820 г.), оптическая активность есть результат *кругового двулучепреломления*, т. е. разных скоростей распространения в среде света, поляризованного по кругу вправо и влево. В правой волне вектор напря-

женности электрического поля в луче, идущем в глаз наблюдателя, вращается по часовой стрелке, в левой — против часовой стрелки. Линейно поляризованную волну можно разложить на правую и левую волны, поляризованные по кругу — электрический вектор, колеблющийся вдоль одного направления, есть сумма двух векторов, вращающихся по кругу по и против часовой стрелки (рис. 5.14, *а*). Если одна из этих волн распространяется быстрее другой, то суммарный вектор поворачивается на угол, тем больший, чем больше разность скоростей (рис. 5.14, *б*), т. е. показателей преломления. При прохождении луча через слой вещества толщиной l плоскость поляризации поворачивается на угол

$$\varphi = \frac{\pi}{\lambda}(n_L - n_D)\, l, \tag{5.14}$$

где λ — длина волны света, n_L и n_D — показатели преломления для левой и правой волн.

Удельным вращением раствора, содержащего c (г/см^3) оптически активного вещества, называется величина

$$\varphi_{уд} = \varphi/lc. \tag{5.15}$$

Если l измеряется в дм, а φ — в радианах, то

$$\varphi_{уд} = \frac{180}{\pi}\,\frac{10}{c}\,\frac{\varphi}{l}\ \text{рад}\cdot\text{дм}^{-1}\cdot\text{г}^{-1}\cdot\text{см}^3. \tag{5.16}$$

Для чистого вещества вместо c надо подставить плотность. *Молекулярным вращением* называется величина

$$\mathscr{M} = \frac{M}{100}\,\varphi_{уд} = \varphi\,\frac{18}{\pi}\,\frac{M}{cl}, \tag{5.17}$$

где M — м. м. оптически активного вещества.

Любое вещество и преломляет, и поглощает свет. В области собственного поглощения света веществом показатель преломления есть комплексная величина

$$\tilde{n} = n - i\varkappa, \tag{5.18}$$

где $\varkappa$ — показатель поглощения, связанный с молекулярным коэффициентом поглощения ε (см. (5.3)) соотношением

$$\varkappa = \varepsilon\,\frac{\lambda c}{4\pi}\,\frac{1000}{M}, \tag{5.19}$$

где M — молекулярная масса, а c выражено в г/см^3. Часто пользуются законом Бугера — Ламберта — Бэра в форме

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon' c' l}. \tag{5.20}$$

Здесь c' выражено в моль $\cdot$ л$^{-1}$, а $\varepsilon' = 0{,}4343\varepsilon$.

Если вещество обладает круговым двулучепреломлением, то оно по-разному поглощает свет, поляризованный по кругу влево и вправо, т. е. обладает и круговым дихроизмом. Угол поворота

плоскости поляризации — также комплексная величина

$$\tilde{\varphi} = \frac{\pi}{\lambda}(\tilde{n}_L - \tilde{n}_D)\, l = \frac{\pi}{\lambda}(n_L - n_D)l - i\frac{\pi}{\lambda}(\varkappa_L - \varkappa_D)\, l. \quad (5.21)$$

В области собственного поглощения линейно поляризованный свет превращается в эллиптически поляризованный. Мерой эллиптичности служит величина

$$\theta = \frac{\pi}{\lambda}(\varkappa_L - \varkappa_D). \quad (5.22)$$

Молекулярная эллиптичность определяется как

$$\theta_{\text{мол}} = \theta\frac{18}{\pi}\frac{M}{c} = 2{,}303 \cdot \frac{4500}{\pi}(\varepsilon'_L - \varepsilon'_D) \equiv 3300\,(\varepsilon'_L - \varepsilon'_D). \quad (5.23)$$

Теория должна объяснить происхождение разностей $n_L - n_D$ и $\varkappa_L - \varkappa_D$ (т. е. $\varepsilon_L - \varepsilon_D$) и установить связь этих величин со строением вещества. В обычной оптике — в теории преломления и дисперсии света — размеры молекул считаются бесконечно малыми по сравнению с длиной волны света λ. Иными словами, не учитываются различия в фазах световой волны в разных точках молекулы. В действительности для малых молекул отношение их размеров к длине волны видимого света имеет порядок величины 10^{-3}, которым в теории оптической активности нельзя пренебрегать — весь эффект определяется именно разностями фаз световой волны в пределах молекулы. Спектрополяриметрия есть своего рода *молекулярная интерферометрия*, чем и объясняется высокая чувствительность оптической активности к изменениям молекулярной структуры.

Таким образом, нельзя пренебрегать расстояниями между электронами молекулы, на которые действует световая волна. Необходимо также учитывать взаимодействие этих электронов — в отсутствие такового нет и оптической активности. И, наконец, молекула или кристалл должны быть хиральными, т. е. не иметь ни плоскости, ни центра симметрии.

В строгой квантовомеханической теории оптической активности (Розенфельд) поворот плоскости поляризации выражается через электрические и магнитные переходные диполи (ср. с. 142). Для изотропной среды, содержащей N_1 хиральных молекул в 1 см^3, получается

$$\varphi = \frac{16\pi^3 N_1 \beta}{\lambda^2}\frac{n^2+2}{3}\, l, \quad (5.24)$$

где n — показатель преломления, а β — константа, характеризующая оптическую активность. Показатель преломления связан с поляризуемостью *а формулой Лоренц — Лоренца*

$$\frac{n^2-1}{n^2+2} = \frac{4\pi}{3} N_1 a. \quad (5.25)$$

Поляризуемость a, определяющая преломление света, и константа β, определяющая круговое двулучепреломление, выражаются

сходным образом:

$$a = \frac{2}{3\hbar} \sum_j \frac{\omega_j p_{0j}^2}{\omega_j^2 - \omega^2}, \tag{5.26}$$

$$\beta = \frac{2\pi c}{3\hbar} \sum_j \frac{\mathrm{Im}\,\{\mathbf{p}_{0j}\mathbf{m}_{j0}\}}{\omega_j^2 - \omega^2}. \tag{5.27}$$

Эти формулы справедливы для молекул в основном, электронно невозбужденном состоянии 0, вдали от полос поглощения с частотами $\omega_j \equiv \omega_{0j}$. Здесь ω — круговая частота падающего света, c — скорость света, $\hbar = h/2\pi$, h — постоянная Планка, $\mathbf{p}_{0j}$ — электрический дипольный момент перехода (см. с. 142), $\mathbf{m}_{j0}$ — *магнитный дипольный момент перехода*. Символ Im показывает, что в β входят лишь мнимые части комплексных произведений $\mathbf{p}_{0j}\mathbf{m}_{j0}$. Суммирование производится по всем переходам $0 \to j$. Как мы видели (с. 142), величина $p_{0j}^2 = D_j$, именуемая дипольной силой, непосредственно связана с интенсивностью поглощения света. Сумма дипольных сил по всем переходам $0 \to j$ есть константа, пропорциональная числу электронов в молекуле. Величина

$$R_j = \mathrm{Im}\,\{\mathbf{p}_{0j}\mathbf{m}_{j0}\} \tag{5.28}$$

называется *вращательной силой* перехода $0 \to j$.

В отличие от суммы дипольных сил, сумма вращательных сил по всем j равна нулю.

Это легко доказывается:

$$\sum_j R_j = \sum_j \mathrm{Im}\left\{\int \psi_0 \mathbf{p} \psi_j^* d\tau \int \psi_j \mathbf{m} \psi_0^* d\tau\right\} =$$

$$= \mathrm{Im}\left\{\int \psi_0 (\mathbf{pm})\, \psi_0^* d\tau - \int \psi_0 \mathbf{p} \psi_0^* d\tau \int \psi_0 \mathbf{m} \psi_0^* d\tau\right\} = 0, \tag{5.29}$$

так как диагональные матричные элементы $\langle 0|\mathbf{pm}|0\rangle$, $\langle 0|\mathbf{p}|0\rangle$ и $\langle 0|\mathbf{m}|0\rangle$ вещественны, т. е. их мнимые части равны нулю.

Вращательная сила R_j обращается в нуль при наличии у молекулы плоскости или центра симметрии. Электрический и магнитный сомножители не могут в отсутствие хиральности одновременно отличаться от нуля. В этих случаях все состояния молекулы делятся на четные и нечетные, в зависимости от того, сохраняет ли волновая функция знак или меняет его при отражении соответственно в центре или в плоскости. Операторы моментов $\mathbf{p}$ и $\mathbf{m}$ в декартовых координатах имеют вид

$$\mathbf{p} = e(\mathbf{i}x + \mathbf{j}y + \mathbf{k}z),$$

$$\mathbf{m} = -i\frac{e\hbar}{2m_e c}\left\{\mathbf{i}\left(y\frac{\partial}{\partial z} - z\frac{\partial}{\partial y}\right) + \mathbf{j}\left(z\frac{\partial}{\partial x} - x\frac{\partial}{\partial z}\right) + \mathbf{k}\left(x\frac{\partial}{\partial y} - y\frac{\partial}{\partial x}\right)\right\}, \tag{5.30}$$

где e и m_e — заряд и масса электрона, $\hbar = h/2\pi$, h — постоянная Планка, c — скорость света, $\mathbf{i}$, $\mathbf{j}$, $\mathbf{k}$ — единичные векторы вдоль осей координат. Допустим, что молекула имеет центр симметрии. При отражении в центре $\mathbf{p}$ меняет знак, а $\mathbf{m}$ — сохраняет. Поэтому $\langle 0|\mathbf{p}|j\rangle$ не равно нулю только при переходах от нечетных к четным состояниям и наоборот. Напротив, $\langle j|\mathbf{m}|0\rangle$ отлично от нуля лишь для переходов между состояниями одинаковой четности. Следовательно, скалярное произведение этих матричных элементов равно нулю для любых переходов. Аналогичным образом доказывается равенство нулю R_j для молекул с плоскостью симметрии.

При переходе от правого антипода к левому знак R_j, знак вращения, меняется. По порядку величины R_j равно произведению электрического и магнитного моментов молекулы. Переходной момент p_{0j} имеет порядок $1\,D = 10^{-18}$ ед. СГСЭ, магнитный момент электрона $0{,}93 \cdot 10^{-20}$ эрг $\cdot$ Гс$^{-1}$. Следовательно, порядок величины R_j есть 10^{-38} ед. СГСЭ. Удобно пользоваться значением приведенной вращательной силы, выражаемым числом порядка единицы:

$$R' = \frac{100}{\mu_Б p_д} R,$$

где $\mu_Б$ — магнетон Бора, $p_д = 1\,D$.

В области полосы поглощения с частотой ω_j необходимо учесть затухание. Тогда мы получаем комплексное выражение для β:

$$\beta_j = \frac{2c}{3\hbar} \frac{R_j}{\omega_j^2 - \omega^2 + i\omega\Gamma_j} = \frac{2c}{3\hbar} \frac{R_j(\omega_j^2 - \omega^2)}{(\omega_j^2 - \omega^2)^2 + \omega^2\Gamma_j^2} - \frac{2ic}{3\hbar} \frac{R_j\omega\Gamma_j}{(\omega_j^2 - \omega^2)^2 + \omega^2\Gamma_j^2}. \quad (5.31)$$

Величина Γ_j характеризует полуширину полосы поглощения в шкале частот. Первый член в (5.31) описывает вращение плоскости поляризации, второй — круговой дихроизм (с. 150). Аналогичным образом вблизи полосы поглощения получается комплексное выражение для поляризуемости, в котором вещественный член описывает преломление, а мнимый — поглощение света.

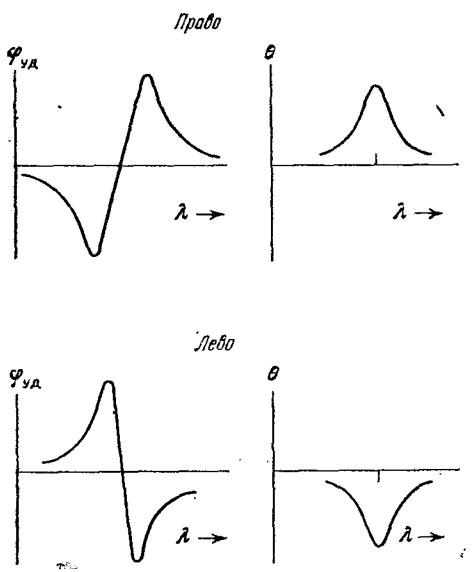


Рис. 5.15. Графики АДОВ и КД. Вверху — кривые для правовращающего вещества, внизу — для левовращающего

Вблизи полосы поглощения наблюдается аномальная дисперсия оптического вращения (АДОВ) и одновременно круговой дихроизм (КД). Модельные кривые для право- и левовращающего вещества показаны на рис. 5.15. Соответствующие кривые для преломления и поглощения аналогичны кривым АДОВ и КД для правовращающего вещества. АДОВ принято называть эффектом Коттона, хотя Коттон открыл именно КД.

Вращательную силу R_j можно определить как из АДОВ, так и из КД. Соответственно, можно перейти от одного эффекта к другому расчетом. Это частный случай *соотношений Кронига — Крамерса*, устанавливающих

связь между вещественной и мнимой частями реакции линейной системы на внешнее воздействие. Вычисление вращения из эллиптичности и наоборот (и аналогичные вычисления для преломления и поглощения) производятся по формулам

$$\varphi(\omega) = \frac{2\omega^2}{\pi} \int_0^\infty \frac{\theta(\omega')}{\omega'(\omega'^2 - \omega^2)} d\omega', \tag{5.32}$$

$$\theta(\omega) = -\frac{2\omega^3}{\pi} \int_0^\infty \frac{\varphi(\omega')}{\omega'^2(\omega'^2 - \omega^2)} d\omega'. \tag{5.33}$$

На практике для определения R_j при исследованиях биополимеров удобнее пользоваться КД, чем АДОВ. Можно показать, что в КД значительно больше отношение сигнала к шуму.

Теоретические расчеты β являются приближенными, так как практически невозможно знать весь набор энергетических уровней молекул и соответствующих волновых функций для прямых вычислений по формуле (5.27).

Молекулу можно мысленно разбить на атомные группы, между которыми нет обмена электронами. Тогда β представится суммой

$$\beta = \beta_1 + \beta_2 + \beta_3 + \beta_4, \tag{5.34}$$

где β_1 — вклады отдельных групп, равные нулю, если группы не хиральны (например, группы CH_3), β_2 — «одноэлектронные» члены, появляющиеся в результате электрических и магнитных дипольных переходов в данной группе, находящейся в асимметричном поле остальных групп. Член β_3 возникает вследствие взаимодействия $\mathbf{m}_{j0}$ одной группы с $\mathbf{p}_{0j}$ другой. Наконец, β_4 определяется одновременным электрическим дипольным возбуждением различных групп. Наиболее существенны вклады β_2 и β_4. Вклад β_4 является результатом электростатического дипольного взаимодействия анизотропно поляризующихся групп в молекуле. Этот вклад определяется поляризуемостями атомных групп и непосредственно зависит от их взаимного геометрического расположения, т. е. от конфигурации и конформации молекулы, и обращается в нуль при наличии плоскости или центра симметрии.

Простейшая модель хиральной молекулы, предложенная Куном, состоит из двух линейных групп, 1 и 2, отстоящих друг от друга на расстояние r и поляризующихся только вдоль своих осей, угол между которыми равен γ (рис. 5.16). В этом случае

$$\beta_4 = {}^1/_6 a_1 a_2 \sin\gamma\cos\gamma/r^3, \tag{5.35}$$

где a_1 и a_2 — поляризуемости групп *1* и *2*. Как мы видели (с. 151), поляризуемость определяется значениями $\mathbf{p}_{0j}$, т. е. интенсивностями соответствующих полос поглощения. Чем интенсивнее полоса, тем больше ее вклад в β_4. Но вращательная сила

определяется произведением $\mathbf{p}_{0j}\mathbf{m}_{j0}$. При больших значениях $\mathbf{p}_{j0}$ величины $\mathbf{m}_{j0}$ обычно малы, и наоборот. В оптической активности могут быть существенны слабые полосы с малыми $\mathbf{p}_{0j}$, но с большими $\mathbf{m}_{j0}$. Такие полосы не вносят заметного вклада в поляризуемость, β_4 не учитывает роли слабых полос.

Вклад β_2 приближенно оценивается с помощью так называемой *одноэлектронной модели*. Применяется формула (5.27), но рассматриваются лишь электроны хромофорных групп, ответственных за длинноволновое поглощение. Хромофорная группа (например, пептидная связь — NH—CO— и т. д.) обычно плоская и оптической активности не имеет. Но, находясь в асимметричном поле соседних атомов хиральной молекулы, группа дает вклад в β_2. Одноэлектронная модель действительно позволяет хорошо описать дисперсию оптической активности и, в особенности, АДОВ и КД в полосе поглощения хромофора. На основе этой модели удается с хорошей точностью вычислять вращательные силы для электронных переходов в хромофорных группах. Изменение конформации молекулы меняет β_2. Теория с успехом была применена для конформационного анализа терпенов, стероидов и т. п.

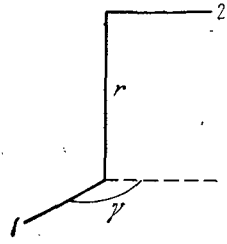


Рис. 5.16. Простейшая модель оптически активной молекулы (Куп)

Современное развитие спектрополяриметрии непосредственно связано с исследованиями структуры природных соединений — с биоорганической химией и молекулярной биологией. В развитии спектрополяриметрии было три этапа. В свое время для характеристики молекул и кристаллов ограничивались значениями $\varphi_{уд}$ при одной длине волны света. Это давало очень скудную информацию. В дальнейшем обратились к измерению дисперсии вне области поглощения. Наконец, в последнее время измеряются эффект Коттона (АДОВ) и КД в полосах поглощения вещества. Это наиболее информативно, но требует высокой чувствительности аппаратуры (измерение вращения с точностью до 10^{-4} град) и возможности измерений в широком интервале длин волн (для белков вплоть до 180—230 нм).

§ 5.7. Естественная оптическая активность биополимеров

Применительно к полимерам рационально выражать оптическое вращение и КД в величинах, отнесенных к одному мономеру. Среднее вращение мономера определяется как

$$m' = \frac{M_0}{100}\varphi_{уд}, \qquad (5.36)$$

где M_0 — средняя м. м. мономера. Грубый учет влияния растворителя состоит во введении поправки Лорентца. Вместо m' при-

меняется приведенное среднее вращение мономера:

$$\tilde{m}' = \frac{3}{n^2+2} m' = \frac{3}{n^2+2} \frac{M_0}{100} \varphi_{\text{уд}}, \qquad (5.37)$$

где n — показатель преломления среды. Для воды при 20°С множитель Лорентца $3/(n^2+2)$ меняется от 0,7945 при 600 нм до 0,7306 при 185 нм.

Биополимеры в ряде случаев обладают двоякой хиральностью — хиральностью мономерных звеньев и хиральностью α-спиралей белков и полипептидов или двуспиральных участков нуклеиновых кислот. При полной денатурации, т. е. при переходах спираль — клубок, сохраняется лишь хиральность мономеров. Соответственно эти переходы сопровождаются резкими изменениями вращения и КД. Эти характеристики очень чувствительны к изменениям конформаций. С помощью АДОВ и КД удается получать ценные сведения о конформациях биополимеров и их изменениях.

Вдали от области собственного поглощения для любой молекулярной системы можно выразить приведенное вращение мономера в виде суммы одночленных *формул Друде* (ср. (5.27))

$$\tilde{m}' = \sum_j \frac{a_j \lambda_j^2}{\lambda^2 - \lambda_j^2}. \qquad (5.38)$$

Здесь λ — длина волны падающего света, λ_j и a_j — константы. Приближенно уравнение (5.38) заменяется одночленной формулой

$$\tilde{m}' = \frac{a_0 \lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2}. \qquad (5.39)$$

Эта формула хорошо описывает оптическое вращение полиаминокислот в состоянии клубка, если $\lambda_0 = 268$ нм. Для α-спирали можно пользоваться *формулой Моффита*

$$\tilde{m}' = \frac{a_0^{(\alpha)} \lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + \frac{b_0^{(\alpha)} \lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2}, \qquad (5.40)$$

где $a_0^{(\alpha)}$ и $b_0^{(\alpha)}$ — константы. Второй член характеризует вклад «второй хиральности». Формулу (5.40) следует считать эмпирической. Согласие формулы (5.40) с опытом для α-спирали получается при $\lambda_0 = 212$ нм и $b_0^{(\alpha)} = -630$, $a_0^{(\alpha)} = 630-650$. Для частично спирализованного белка

$$a_0 = a_0^{(\text{ак})} + x_\alpha a_0^{(\alpha)},$$

где $a_0^{(\text{ак})}$ характеризует вращение, обусловленное аминокислотными остатками, x_α — доля спирализованных остатков. Получаем

$$\tilde{m}' = a_0^{(\text{ак})} \frac{\lambda_1^2}{\lambda^2 - \lambda_1^2} + x_\alpha \left(a_0^{(\alpha)} \frac{\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + b_0^{(\alpha)} \frac{\lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2} \right). \qquad (5.41)$$

Разлагая первый член в ряд по $(\lambda^2 - \lambda_0^2)^{-1}$ и ограничиваясь вторым членом разложения, получаем

$$\tilde{m}' = a_0^{(\text{ак})} \frac{\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + b_0^{(\text{ак})} \frac{\lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2} + x_\alpha \left(a_0^{(\alpha)} \frac{\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + b_0^{(\alpha)} \frac{\lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2} \right). \quad (5.42)$$

Обычно $b_0^{(\text{ак})}$ мало и лежит в пределах ± 50. Величина $a_0^{(\text{ак})}$ находится из данных по дисперсии вращения для денатурированных белков. Для нахождения x_α строится зависимость $\tilde{m}'$ $(\lambda^2/\lambda_0^2 - 1)$ от $(\lambda^2/\lambda_0^2 - 1)^{-1}$. Получается прямая с наклоном $x_\alpha b_0^{(\alpha)}$; отрезок, отсекаемый на оси ординат, равен $a_0^{(\text{ак})} + x_\alpha a_0^{(\alpha)}$. Таким образом, значение x_α определяется двумя независимыми способами. Следует отметить, что присутствие ароматических остатков заметно влияет на значения констант в уравнении Моффита. Степень спиральности x_α, определенная таким образом для ряда белков, хорошо согласуется с результатами других поляриметрических определений (с помощью одночленной или двучленной формул Друде). Эта величина согласуется также с данными рентгеноструктурного анализа.

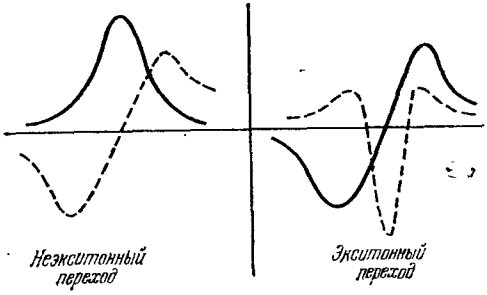


Рис. 5.17. Кривые АДОВ (сплошные линии) и КД (штриховые) для неэкситонного и экситонного вкладов

Строгая квантовомеханическая теория оптической активности гомополимера рассматривает резонансное расщепление электронных энергетических уровней мономеров в зону — экситонное расщепление (см. с. 143). Расчет вращательных сил зависит от того, является ли рассматриваемый переход $0 \to j$ «сильным» оптическим переходом с большим $\mathbf{p}_{0j}$, но малым $\mathbf{m}_{j0}$ или «слабым» переходом с малым $\mathbf{p}_{0j}$, но большим $\mathbf{m}_{j0}$. Для «сильных» переходов можно выделить экситонный вклад, обусловленный взаимодействием возбужденных уровней в разных мономерах. Сумма экситонных вращательных сил по всем мономерам равна нулю — эти вклады «консервативны». Неэкситонные вклады, определяемые взаимодействием уровня j с другими уровнями, на которые разрешены переходы, условию консервативности не удовлетворяют. На рис. 5.17 показаны типичные кривые АДОВ и КД экситонного и неэкситонного взаимодействий для консервативного и неконсервативного вкладов. Для α-спирали неэкситонные вклады значительно меньше экситонных: теоретическая кривая КД для α-спирали длиной в 20 звеньев имеет три экстремума в области

лл*-переходов (см. с. 142) с экситонными вкладами в R (в 10^{-40} эрг · см^5), равными −221, 321, −100 (их сумма равна нулю) и неэкситонными соответственно 3,8, −8,6 и −17,1.

Другая регулярная форма полипептидной цепи — β-форма — в принципе также описывается формулой Моффита, но с малым значением b_0. Опыт и расчет дают $b_0^{(\beta)} = -30$. Подробный анализ КД в области лл*-перехода показывает, что и у параллельной,

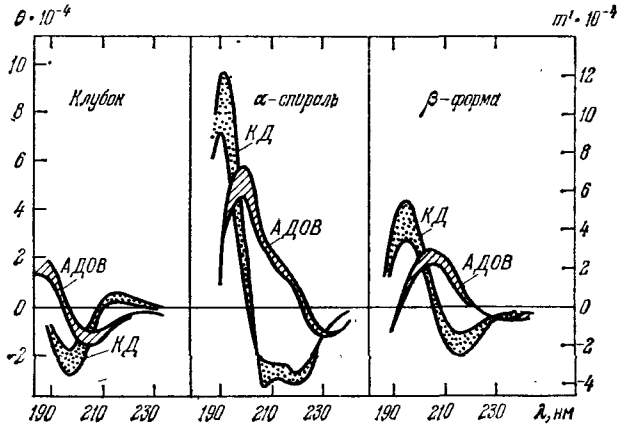


Рис. 5.18. Кривые АДОВ и КД для L-полипептидов

и у антипараллельной β-формы доминирует неэкситонный вклад. На рис. 5.18 показаны кривые АДОВ и КД для L-полипептидов в различных конформациях.

Для понимания оптической активности нуклеиновых кислот необходимо рассмотреть явление *индуцированной оптической активности* (ИОА). Симметричные, т. е. лишенные хиральности, молекулы красителей, будучи присоединены к α-спиральным полипептидам, обнаруживают АДОВ и КД в областях собственного поглощения. Этот эффект исчезает при денатурации комплекса α-спирали с красителем. Эффект объясняется взаимодействием молекулы красителя с пептидным остатком вблизи асимметричного центра. О том же свидетельствует ИОА простетических групп и коферментов. АДОВ и КД в области поглощения *пиридоксальфосфата* — кофермента *аспартатаминотрансферазы* (с. 184) послужили источником информации о структуре активного центра этого фермента. На рис. 5.19 показаны кривые АДОВ дезоксигемоглобина, оксигемоглобина и карбоксигемоглобина в областях поглощения простетической группы гема, которая сама по себе симметрична (см. с. 50). Под влиянием хиральности биополимера возникает оптическая асимметрия электронной оболочки хромофора. В строгой теории ИОА необходимо рассмотрение колебаний атомных ядер, решение электронно-колебательной задачи.

Оптическая активность нуклеозидов, нуклеотидов, ДНК и РНК характеризуется АДОВ и КД в областях поглощения около 260 нм — в полосах поглощения азотистых оснований. Эти основания плоские и хиральности не имеют, АДОВ и КД возникают

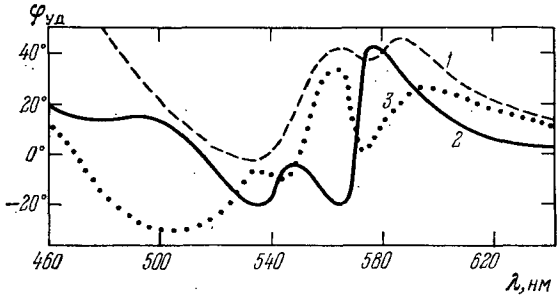


Рис. 5.19. Кривые АДОВ дезоксигемоглобина (*1*), оксигемоглобина (*2*) и карбоксигемоглобина (*3*)

вследствие присоединения оснований к хиральным сахарам. Следовательно, эти эффекты определяются индуцированной оптической активностью. Действительно, замена β-рибозы или β-дезоксирибозы на соответствующие α-соединения меняет знак эффекта.

Вращательная сила R_i (5.28) есть тензорная, а не скалярная величина, она имеет разные значения по разным направлениям в молекуле. В обычных условиях в жидкости измеряется значение R_j, усредненное по всем направлениям. В дальнейшем были измерены анизотропные значения R_j для комплексов ДНК с красителями и антибиотиками. Метод состоит в ориентации молекул ДНК в потоке через оптическую ячейку, представляющую собой набор капилляров. КД измеряется дважды — без ориентации, когда

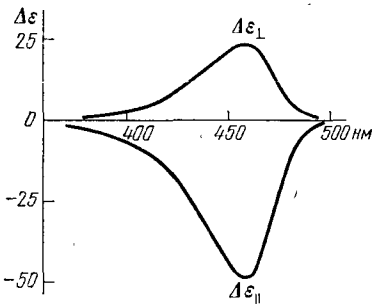


Рис. 5.20. Кривые $\Delta\varepsilon_{\parallel}$ и $\Delta\varepsilon_{\perp}$ для комплекса ДНК — профлавин

$$\Delta\varepsilon = {}^1/_3(\Delta\varepsilon_{\parallel} + 2\Delta\varepsilon_{\perp}), \quad (5.43)$$

и при ориентации молекул ДНК, когда

$$\Delta\varepsilon_{\text{ор}} = (1 - q)\Delta\varepsilon + q\,\Delta\varepsilon_{\parallel}. \quad (5.44)$$

Здесь $\Delta\varepsilon$ и $\Delta\varepsilon_{\text{ор}}$ — измеряемые амплитуды КД, $\Delta\varepsilon_{\parallel}$ и $\Delta\varepsilon_{\perp}$ — значения КД вдоль и поперек оси двойной спирали, q — степень ориентации, определяемая по линейному дихроизму ДНК. На рис. 5.20 показаны кривые $\Delta\varepsilon_{\parallel}$ и $\Delta\varepsilon_{\perp}$ для комплекса ДНК — профлавин. Примечательно, что эти величины имеют разные знаки и, следовательно, измеряемое значение $\Delta\varepsilon$ является малой разностью двух больших величин. Изучение анизотропии вращательной силы дает ценную информацию о структуре биополимеров и их комплексов.

В ориентированной системе условия симметрии особые — возможна оптическая активность и у молекул, имеющих плоскости симметрии, но лишенных центра симметрии. Эта *«скрытая» оптическая активность*, проявляющаяся лишь при ориентации, была открыта при изучении комплексов ДНК и РНК (Макаров и Полетаев). Установлено, что молекулы красителя в комплексах перпендикулярны к оси двойной спирали нуклеиновой кислоты.

§ 5.8. Магнитная оптическая активность

В 1845 г. Фарадей записал в своем дневнике «...в конце концов мне удалось намагнитить и наэлектризовать луч света и осветить магнитную силовую линию». Речь шла об открытии магнитного вращения плоскости поляризации света, распространяющегося вдоль направления магнитного поля. Это явление получило название *эффекта Фарадея*. Приведенные слова имеют лишь фигуральный смысл — магнитное поле действует не на свет, а на вещество, которое обретает в поле круговое двулучепреломление. Сравнительно недавно эффект Фарадея — *магнитное оптическое вращение* (МОВ) и *магнитный круговой дихроизм* (МКД) — нашли важные применения в молекулярной биофизике.

Угол вращения φ, выраженный формулой (5.14), пропорционален напряженности магнитного поля H (*формула Беккереля*):

$$\varphi = \frac{\pi}{\lambda}(n_L - n_D)\, l = \mathscr{V} l H, \tag{5.45}$$

$\mathscr{V}$ — константа магнитного вращения (*постоянная Верде́*). В классической электронной теории эффект Фарадея сводится к *эффекту Зеемана*. Электрон, рассматриваемый как гармонический осциллятор, колеблется в отсутствие магнитного поля с круговой частотой ω_0. В магнитном поле, направленном вдоль луча света, спектральная линия с частотой ω_0 расщепляется на две, поляризованные по кругу влево и вправо. Величина расщепления равна $2|\omega_H|$, где ω_H — круговая частота *ларморовой прецессии*

$$\omega_H = -eH/(2m_e c) \tag{5.46}$$

(e, m_e — заряд и масса электрона, c — скорость света).

Круговое двулучепреломление выражается величиной

$$\Delta n = n_L - n_D = \left(\frac{\partial n}{\partial \omega}\right)_{H=0} \cdot 2|\omega_H| = \frac{eH}{m_e c}\left(\frac{\partial n}{\partial \omega}\right)_{H=0} \tag{5.47}$$

или

$$\Delta n = \lambda^2 \left(\frac{\partial n}{\partial \lambda}\right)_{H=0} \cdot \frac{eH}{2\pi m_e c^2}, \tag{5.48}$$

где λ — длина волны света. Следовательно,

$$\varphi = \frac{eH}{2m_e c^2}\lambda \left(\frac{\partial n}{\partial \lambda}\right)_{H=0} \cdot l \tag{5.49}$$

и

$$\mathcal{V} = \frac{e\lambda}{2m_e c^2}\left(\frac{\partial n}{\partial \lambda}\right)_{H=0}. \qquad (5.50)$$

Мы получили формулу Беккереля (5.45). Она грубо согласуется с опытом в области, далекой от полос поглощения, для диамагнитных веществ.

Подлинная теория эффекта может быть только квантовомеханической. Под влиянием магнитного поля происходит несколько явлений. Во-первых, расщепляется основной энергетический уровень электронной системы — вместо ω_0 имеем $\omega_L = \omega_0 - \gamma_0 H$ и $\omega_D = \omega_0 + \gamma_0 H$, где $\gamma_0 = \omega_H/H$. Во-вторых, у правой и левой волн возникают различные вероятности перехода, т. е. коэффициенты поглощения $\varepsilon_L = \varepsilon(1 + bH)$ и $\varepsilon_D = \varepsilon(1 - bH)$. В-третьих, расщепляются и возбужденные уровни: $\omega_L = \omega_0 - \gamma_e H$, $\omega_D = \omega_0 + \gamma_e H$. Если молекулы парамагнитны, то поле H изменяет населенности подуровней основного уровня — различие в населенностях дает множители 1 и $1 - 2\gamma_0 H/\kappa T$. Получаем ($f(x)$ — функция от x)

$$\begin{aligned} \varepsilon_L &= \varepsilon(1 + bH) f\{\omega - (\gamma_0 + \gamma_e) H\}, \\ \varepsilon_D &= \varepsilon(1 - bH) f\{\omega + (\gamma_0 + \gamma_e) H\}(1 - 2\gamma_0 H/\kappa T) \end{aligned} \qquad (5.51)$$

и, разлагая $\Delta\varepsilon$ в ряд по H и ограничиваясь линейными членами, находим

$$\Delta\varepsilon = 2\varepsilon H\left\{-(\gamma_0 + \gamma_e)\frac{df(\omega)}{d\omega} + \left(b + \frac{\gamma_0}{\kappa T}\right) f(\omega)\right\} = A_0 + A_e + B + C/\kappa T. \qquad (5.52)$$

Возникновение МОВ и МКД иллюстрируется рис. 5.21. В отсутствие магнитного поля (рис. 5.21, *а*) имеются два электронных перехода с невырожденного основного уровня E_0 на дважды вырожденный возбужденный уровень E_e. Частоты переходов, отвечающие правой и левой волнам, и соответствующие показатели преломления и поглощения совпадают и $n_L(\omega) = n_D(\omega)$ и $\varepsilon_L(\omega) = \varepsilon_D(\omega)$. (Кривые $n_D(\omega)$ и $\varepsilon_D(\omega)$ для удобства показаны с обратным знаком.) Рис. 5.21, *б* объясняет возникновение эффекта типа A_e, являющегося результатом расщепления возбужденного уровня E_e. Кривые $n_L(\omega)$ и $n_D(\omega)$ (и, соответственно, $\varepsilon_L(\omega)$ и $\varepsilon_D(\omega)$) симметрично смещаются, возникает симметричная кривая $\Delta n(\omega)$ в МОВ и асимметричная кривая $\Delta\varepsilon(\omega)$ в МКД. Наконец, эффект типа C (рис. 5.21, *в*) появляется в результате вырождения основного состояния E_0, снятия вырождения магнитным полем и появления разности населенности подуровней в соответствии с законом Больцмана. Эффекты типа C асимметричны в МОВ и симметричны в МКД.

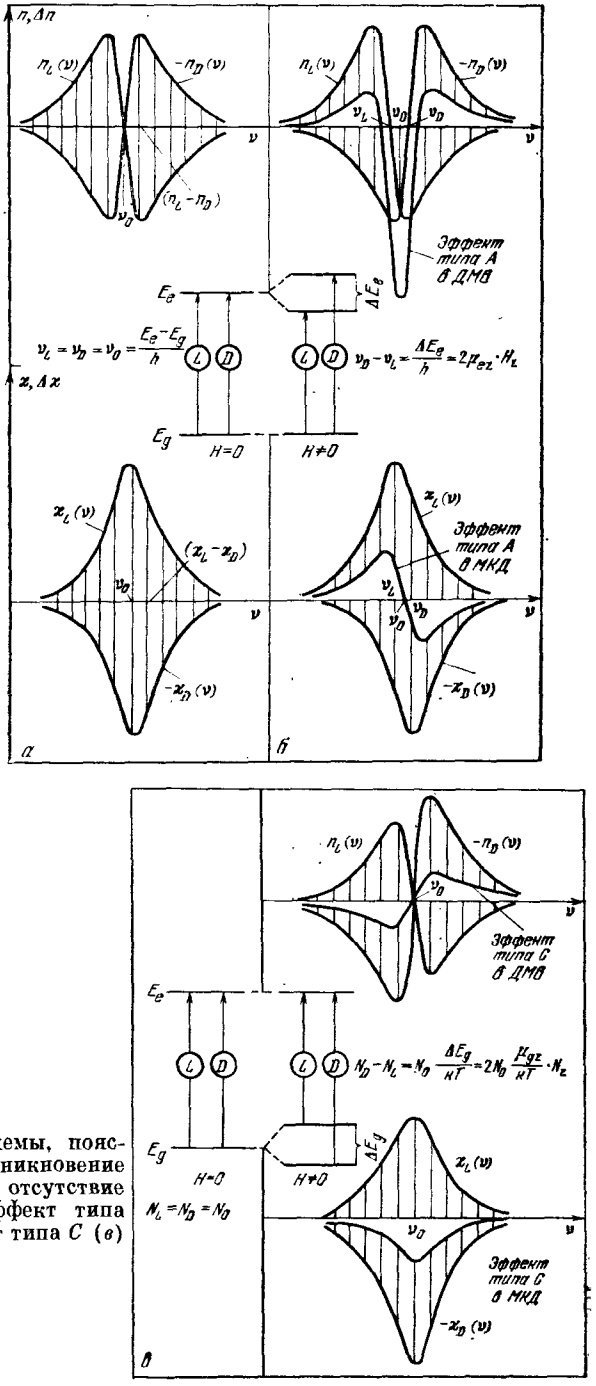


Рис. 5.21. Схемы, поясняющие возникновение МОВ и МКД: отсутствие поля (*а*), эффект типа *A* (*б*), эффект типа *C* (*в*)

Строгая квантовомеханическая теория дает в области собственного поглощения удельное вращение

$$\varphi(0 \to j) = -\frac{4\pi N_1}{\hbar c}\left\{\frac{2\omega_j\omega^2\left[(\omega_j^2-\omega^2)^2-\omega^2\Gamma_j^2\right]}{\hbar\left[(\omega_j^2-\omega^2)^2+\omega^2\Gamma_j^2\right]^2}A_j + \right.$$

$$\left. + \frac{\omega^2(\omega_j^2-\omega^2)}{(\omega_j^2-\omega^2)^2+\omega^2\Gamma_j^2}(B_j + C_j/\kappa T)\right\} H, \qquad (5.53)$$

где $\omega_j \equiv \omega_{0j}$, N_1 — число молекул в единице объема и (для изотропной среды)

$$A_j = {}^1/_6 (m_{jj} - m_{00})\ \mathrm{Im}\,(\mathbf{p}_{0j}\mathbf{p}_{j0}),$$

$$B_j = {}^1/_3\ \mathrm{Im}\left\{\sum_{k\neq 0}\frac{m_{k0}}{\hbar\omega_{k0}}\mathbf{p}_{0j}\mathbf{p}_{jk} + \sum_{k\neq j}\frac{m_{j0}}{\hbar\omega_{kj}}\mathbf{p}_{0j}\mathbf{p}_{k0}\right\}, \qquad (5.54)$$

$$C_j = {}^1/_6 m_{00}\ \mathrm{Im}\,(\mathbf{p}_{0j}\mathbf{p}_{j0}).$$

Формула (5.53) переходит в выражение для вклада перехода $0 \to j$ во вращение вдали от области поглощения, если положить в ней $\Gamma_j = 0$. МКД описывается удельной эллиптичностью

$$\theta(0 \to j) = -\frac{4\pi N_1}{\hbar c}\left\{\frac{4\omega_j\omega^3(\omega_j^2-\omega^2)^2\Gamma_j}{\hbar\left[(\omega_j^2-\omega^2)^2+\omega^2\Gamma_j^2\right]^2}A_j + \right.$$

$$\left. + \frac{\omega^3\Gamma_j}{(\omega_j^2-\omega^2)^2+\omega^2\Gamma_j^2}(B_j + C_j/\kappa T)\right\} H. \qquad (5.55)$$

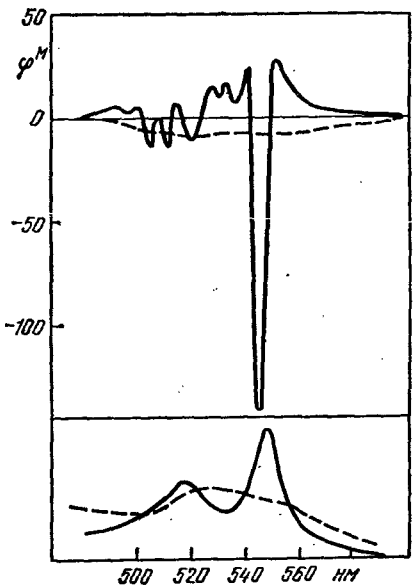


Рис. 5.22. Спектры поглощения окисленного (штриховые кривые) и кривые АДМВ восстановленного (сплошные) цитохрома *c*

Эффект Фарадея никак не связан с естественной оптической активностью — он наблюдается в веществах, построенных как из хиральных, так и нехиральных молекул. При вторичном прохождении луча света, отраженного от зеркала, через оптически активное вещество вращение компенсируется и исчезает, а эффект Фарадея удваивается.

Экспериментальное наблюдение аномальной дисперсии магнитного вращения (АДМВ) и МКД с успехом проводится на системах с сильным магнитным вращением при относительно малом поглощении. Таковы, в частности, порфириновые соединения — гемсодержащие белки, хлорофилл и т. д. Эффект пропор-

ционален H, поэтому он особенно велик в магнитных полях, создаваемых сверхпроводниками и достигающих 50 000 Гс и более. В обычных условиях удается получать поля до 20—30 тыс. Гс.

Относительные значения МКД различных органических соединений характеризуются следующими величинами: для порфиринов $\sim$100, аннуленов $\sim$3, пуринов $\sim$0,2, циклогексанона $\sim$0,00002. Эффект Фарадея для гемсодержащих белков сильно зависит от электронных состояний гема и конформаций белка. На рис. 5.22 показаны кривые АДМВ и спектры поглощения нативного окисленного (ферри-) и восстановленного (ферро-) цитохрома *с*. Хорошо видна тонкая структура МОВ феррицитохрома *с*. В спектре поглощения ее нет. Высокая чувствительность АДМВ и МКД позволяет изучать различные цитохромы во взвесях субмитохондриальных частиц (см. § 13.2). Спектры поглощения такой возможности не дают. При очень низких температурах удается наблюдать неравновесные возбужденные конформации таких белков (Шаронов). См. также § 6.7.

§ 5.9. Колебательные спектры

Частоты, интенсивности и поляризации линий и полос в колебательных спектрах дают информацию о строении молекул. Колебательные спектры наблюдаются либо в поглощении в инфракрасной области (ИК), либо в рассеянии — спектры комбинационного рассеяния (КР). Комбинационное рассеяние было открыто в 1928 г. (Раман, Мандельштам и Ландсберг). Возможность изучать колебания молекул с помощью спектроскопии в видимой области обещала многое, но применительно к полимерам и биополимерам спектры КР оказались вначале бесплодными ввиду невозможности получения растворов в оптически чистом виде, без паразитного рассеяния. На протяжении ряда лет колебательные спектры биополимеров изучались лишь как ИК-спектры поглощения, и лишь в последнее время благодаря развитию лазерной техники ИК-спектроскопия вытесняется КР.

Теория колебательных спектров молекул детально разработана (Волькенштейн, Ельяшевич, Степанов, Грибов). Она основана на возможности раздельного рассмотрения медленных колебаний атомных ядер и быстрых электронных переходов, доказываемой *теоремой Борна и Оппенгеймера*. Задача о частотах колебаний ядер является классической. Она решается при непосредственном учете симметрии молекулы. Теория интенсивностей и поляризаций в ИК-спектрах и спектрах КР исходит из *валентно-оптической схемы*, согласно которой каждой ковалентной связи можно приписать свои дипольный момент и поляризуемость. Дипольный момент молекулы является векторной суммой дипольных моментов связей, а поляризуемость молекулы — тензорной суммой поляризуемостей связей. Интенсивность данной полосы в ИК-спектре определяется изменением дипольного момента молекулы при

данном нормальном колебании, в спектре КР — изменением поляризуемости.

Молекула, состоящая из N атомов, имеет $3N - 6$ нормальных колебаний (линейная молекула — $3N - 5$). Так как атомы в молекуле связаны друг с другом, все они участвуют в каждом из этих колебаний. Возможны ситуации, в которых доля участия в данном колебании определенной ковалентной связи, атома или группы атомов значительно больше, чем остальных связей и атомов. Такое колебание *характеристично* для данной атомной группы, его частота и интенсивность ИК-полосы или линии в спектре КР мало зависят от остальных атомов в молекуле. Тем самым наличие характеристической спектральной полосы или линии свидетельствует о присутствии в молекуле соответствующей группы.

В ИК-спектрах белков и полипептидов наблюдаются полосы амидной группы, т. е. пептидной связи — CO—NH—. Исследование низкомолекулярных амидов, в частности, метилацетамида $H_3C—CO—NH—CH_3$ и родственных веществ, и теоретические расчеты позволили получить колебательные характеристики амидной группы (табл. 5.2).

Таблица 5.2. **Характеристики колебаний амидных групп**

Полоса	Частота, $см^{-1}$	Характер колебания	Участие групп, в долях единицы
Амид A	3300	N—H(ν)	
Амид B	3100		
Амид I	1597—1672	C=O(ν)	C=O(ν) 0,8, C—N(ν) 0,1, —NH(δ) 0,1
Амид II	1480—1575	—NH(δ) в плоскости, C—N(ν)	—NH(δ) 0,6, C—N(ν) 0,4
Амид III	1229—1301	C—N(ν), —NH(δ) в плоскости	C=O(ν) 0,1 C—N(ν) 0,3 N—H(ν) 0,3 O=C—N(δ) 0,1
Амид IV	625—767	O=C—N(δ) в плоскости	O=C—N(δ) 0,4 остальные 0,6
Амид V	640—800	—NH(δ), неплоское колебание	
Амид VI	537—606	—CO(δ), неплоское колебание	
Амид VII	200	Крутильное колебание вокруг C—N-связи	

ν — обозначает *валентное колебание*, т. е. растяжение связей,
δ — *деформационное колебание*, при котором меняется валентный угол.

Формы перечисленных колебаний показаны на рис. 5.23. ИК-полосы A, B, I и II чувствительны к водородным связям, наличие которых вызывает значительное понижение частот и расширение полос.

При рассмотрении спектров полимеров необходимо учесть взаимодействие колебаний в отдельных мономерных звеньях. Упорядоченный полимер подобен в этом смысле молекулярному кристаллу, в спектре которого наблюдаются лишь те колебания,

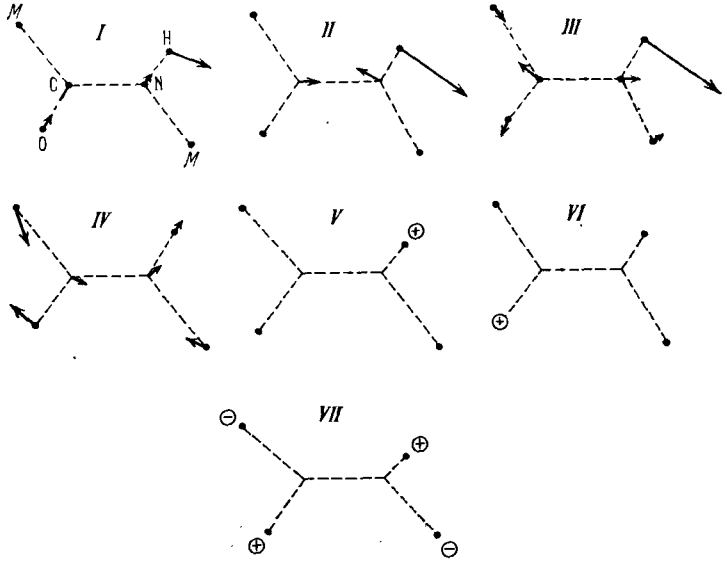


Рис. 5.23. Формы нормальных колебаний амидной группы в N-метилацетамиде (*M* — метильная группа)

которые происходят в фазе во всех элементарных ячейках. Полосы амидной группы, в частности, амид I и амид II, оказываются характеристическими для α-спирали, β-формы и неупорядоченной формы полипептидной цепи. Это показано в табл. 5.3.

Спектры растворов или неориентированных пленок не дают информации о поляризации колебаний. Напротив, при исследовании белков или полипептидов в анизотропных средах (в ориентированных пленках и волокнах) с помощью поляризованного ИК-излучения поляризация колебаний наблюдается непосредственно. Измеряется инфракрасный *дихроизм*, характеризуемый отношением коэффициентов поглощения, измеренных для излучения с направлением электрического вектора световой волны, параллельным и перпендикулярным выделенному направлению.

Таким образом, ИК-спектры могут быть применены для определения вторичной структуры белка, для изучения ионизации аминокислотных остатков и, что особенно важно, для изучения кинетики *дейтерообмена*.

ИК-спектроскопия нуклеиновых кислот менее информативна и практически не используется.

В последнее время значение ИК-спектроскопии в физике белков заметно уменьшилось. Для определения вторичной структуры другие методы (прежде всего КД) оказываются более эффек-

тивными. Напротив, лазерная спектроскопия КР позволяет получать весьма детальную информацию о строении белков и других биологически функциональных веществ. Получаются прекрасные спектры КР растворов, кристаллических и аморфных

Таблица 5.3. **Характеристики полос амид I и амид II**

Конформация	Обозначения колебаний	Частота, $см^{-1}$	
		амид I	амид II
Неупорядоченная	ν_0	1658	1520
Антипараллельная	$\nu_{\parallel}$	1658 (сл.)	1530 (с.)
β-форма	$\nu_{\perp}$	1632 (с.)	1510 (сл.)
	$\nu_{\perp}$	1668 (о. сл.)	1550 (сл.)
Параллельная	$\nu_{\parallel}$	1648 (сл.)	1530 (с.)
β-форма	$\nu_{\perp}$	1632 (о. сл.)	1530 (сл.)
α-спираль	$\nu_{\parallel}$	1650 (с.)	1516 (сл.)
	$\nu_{\perp}$	1646 (сл.)	1546 (с.)

с.— сильная, сл.— слабая, о. сл.— очень слабая полосы в ИК-спектре, $\parallel$ и $\perp$ — полосы, отвечающие колебаниям дипольного момента, параллельным и перпендикулярным к полимерной цепи.

веществ, а также веществ в газовой фазе. Наиболее интересные результаты получаются с помощью *резонансного комбинационного рассеяния* (РКР). В этом случае длина волны рассеиваемого лазерного света попадает в область собственного поглощения хромофора биологической молекулы. Интенсивности РКР очень велики, что позволяет изучать биологические молекулы даже при очень малых концентрациях. Методом РКР изучены гемсодержащие белки, хлорофилл, фермент-субстратные комплексы и т. д.

Если молекула не содержит хромофора, необходимого для наблюдения РКР, то хромофор в качестве метки может быть введен посредством химического или нехимического связывания.

В последнее время проведены расчеты форм и частот нормальных конформационных, т. е. крутильных, колебаний для ряда белков. Исследованы колебания доменов относительно друг друга (Левитт). Участки с различной вторичной структурой характеризуются разными областями частот: α-спирали 50—110 $см^{-1}$, β-слои 5—30 $см^{-1}$, неупорядоченные поворотные участки 5—75 $см^{-1}$. Колебательные линии в этих низкочастотных областях действительно удается наблюдать в спектрах КР белков. Соответствующие движения имеют коллективный характер.

§ 5.10. Спектры ядерного и электронного парамагнитного резонанса

Спектры ядерного и электронного парамагнитного резонанса (ЯМР и ЭПР) широко применяются в биофизике.

Рассмотрим сущность парамагнитного резонанса.

Внесем частицу с магнитным моментом μ в постоянное магнитное поле напряженностью H_0. Магнитный момент будет прецессировать вокруг направления поля (рис. 5.24, *а*) с частотой, пропорциональной H_0 (ср. (5.46)):

$$\omega_0 = \gamma H_0 = \frac{\mu}{p} H_0, \qquad (5.56)$$

где p — механический момент количества движения частицы (например, спин электрона). Подвергнем прецессирующую частицу действию слабого переменного поля H_1, направленного перпендикулярно H_0. Линейно поляризованное поле H_1 можно разложить на две круговых компоненты (с. 148). Одна из этих компонент совпадает по направлению с прецессией. Если частота колебаний H_1 совпадает с ω_0, то возникает резонанс, сильное поглощение волны H_1. Это явление было открыто в 1945 г. Завойским.

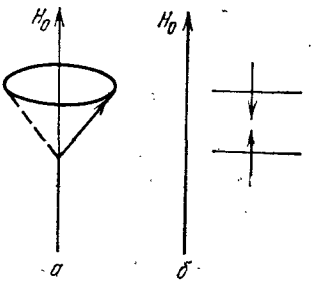


Рис. 5.24. Схема парамагнитного резонанса: классическая (*а*) и квантовомеханическая (*б*) модели

Таково элементарное классическое описание эффекта. Квантовая механика показывает, что уровни энергии частицы, обладающей магнитным моментом, расщепляются в магнитном поле. Начнем с ЯМР. Атомные ядра, у которых нечетно хотя бы одно из двух чисел — масса или порядковый номер,— имеют ядерный спин и, тем самым, ядерный магнитный момент. Ядерный спин равен нулю у ^{12}C, ^{16}O и т. д. и не равен нулю у H, D, ^{13}C, ^{19}F и т. д.

Если J — ядерное спиновое число, то соответствующий магнитный момент равен $[J(J+1)]^{1/2}\gamma\hbar$, где $\gamma\hbar = g\mu_0$ — *гиромагнитное отношение*, g — *фактор расщепления*, а μ_0 — *ядерный магнетон*. В магнитном поле H_0 вследствие зеемановского расщепления (см. с. 159) возникает $2J+1$ уровней с энергиями

$$E = -\gamma\hbar H_0 m \qquad (m = J,\ J-1,\ \ldots,\ -J). \qquad (5.57)$$

Расстояние между соседними уровнями равно $\gamma H_0\hbar$. Для протона $J = {}^1/_2$ и в поле H_0 возникают два уровня, соответствующие параллельному и антипараллельному направлениям спина (рис. 5.24, *б*). Резонанс происходит при

$$\hbar\omega_0 = \gamma\hbar H_0 = g\mu_0 H_0, \qquad (5.58)$$

где

$$\mu_0 = \frac{e\hbar}{2m_p} = 5{,}05\cdot 10^{-24}\ \text{эрг/Гс}, \qquad (5.59)$$

e — заряд протона, m_p — его масса. Фактор g для протона равен 5,58. Если $H_0 = 10\,000$ Гс, то резонансная частота для протонов равна 42,6 МГц, что соответствует диапазону метровых радиоволн.

При данной температуре T число протонов на нижнем уровне несколько больше, чем на верхнем. Отношение населенностей верхнего и нижнего уровней в равновесии выражается фактором Больцмана (см. с. 160)

$$\exp(-\hbar\omega_0/\kappa T) = \exp(-g\mu_0 H_0/\kappa T) \approx 1 - g\mu_0 H_0/\kappa T. \qquad (5.60)$$

Экспонента заменяется двумя первыми членами разложения в ряд, так как $g\mu_0 H_0 \ll \kappa T$ при $T = 300$ К и обычных значениях H_0. При $H_0 = 10^4$ Гс фактор Больцмана равен $(1-14)\cdot 10^{-6}$.

При включении радиочастотного поля H_1 происходят переходы с нижнего уровня на верхний (поглощение) и обратно (испускание). Если вероятности обоих процессов одинаковы, то должно возникнуть быстрое насыщение уровней — их населенности выравняются и поглощение прекратится. Это, однако, не наблюдается, так как ядерные спины способны отдавать свою энергию и без излучения. Происходит релаксационный процесс, непрерывно возвращающий систему спинов в равновесное состояние, которому отвечает распределение Больцмана. Он возникает вследствие взаимодействия ядерных спинов с *решеткой*, т. е. с другими ядрами, находящимися в состоянии теплового движения. При выключении поля H_1 выделяющаяся энергия превращается в тепловую энергию решетки. Изменение населенности уровней после выключения поля H_1 описывается уравнением

$$\Delta n(t) = \Delta n(0)\exp(-t/T_1), \qquad (5.61)$$

где $\Delta n(t)$ — избыток протонов в момент времени t на верхнем уровне по сравнению с равновесной населенностью, $\Delta n(0)$ — то же в момент выключения поля $t = 0$, T_1 — *время спин-решеточной релаксации*. Время T_1 зависит от концентрации магнитных ядер в веществе, от подвижности молекул и от температуры. В кристаллах T_1 порядка минут, в газах и жидкостях порядка секунд и меньше. Присутствие парамагнитных примесей может сократить T_1 до 10^{-4} с. Ширина спектральной линии ЯМР тем больше, чем меньше время жизни ядра на данном энергетическом уровне. Спин-решеточная релаксация вносит вклад в ширину линии порядка T_1^{-1}.

Имеется и второй процесс — *спин-спиновое взаимодействие* магнитных ядер. На каждый спин действует кроме поля H_0 локальное поле, создаваемое соседними ядрами и равное

$$H_{\text{лок}} = \frac{\mu}{r^3}(3\cos^2\theta - 1), \qquad (5.62)$$

где r — расстояние ядра до данной точки, θ — угол между μ и r. Условие резонанса поэтому имеет вид

$$\omega_0 = \gamma(H_0 + H_{\text{лок}}), \qquad (5.63)$$

а не (5.56), справедливый для изолированного спина. Порядок величины $H_{\text{лок}}$ — несколько гаусс. Спин-спиновое взаимодействие

также дает вклад в ширину линии, как вследствие неоднородности поля, так и благодаря определяемому этим взаимодействием обмену энергией между протонами. *Время спин-спиновой релаксации* T_2 в твердых телах много меньше T_1 и ширина линии определяется только T_2. В невязких жидкостях T_2 того же порядка, что и T_1, и ширина линии составляет доли герца.

Спектры ЯМР жидкостей и растворов содержат ряд сравнительно узких линий, отвечающих структурно неэквивалентным протонам. Так, в спектре 1,1,2-трихлорэтана $ClH_2C—CHCl_2$ при невысоком разрешении наблюдаются две линии, отвечающие протонам групп CH_2 и CH с отношениями интенсивностей 2 : 1. Это происходит благодаря экранирующему воздействию электронного окружения ядра на его спин. Электроны прецессируют в направлении, противоположном прецессии ядер, и создают вторичное поле $H' = -\sigma H_0$. На ядро действует эффективное поле

$$H_{эф} = H_0 + H' = (1 - \sigma) H_0; \qquad (5.64)$$

σ — *постоянная экранирования*. Ее значение различно вдоль различных направлений в молекуле, т. е. σ — величина анизотропная. В жидкости она усредняется.

Положение спектральной линии ЯМР относительно некоторой эталонной линии называется *химическим сдвигом*. Обычный эталон для протонного резонанса органических соединений — тетраметилсилан $(CH_3)_4Si$, для водных растворов биополимеров — ДСС (2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфоновая кислота). Химический сдвиг выражается отношением сдвига частоты (поля) к эталонному значению, умноженным на 10^6:

$$\delta = \frac{\Delta\omega}{\omega_0} \cdot 10^6 = \frac{\Delta H}{H_0} \cdot 10^6. \qquad (5.65)$$

У биополимеров δ для алифатических протонов варьирует от $-0{,}5$ до $-2{,}0$, ароматических — от $-6{,}0$ до $-8{,}5$ и т. д.

При высоком разрешении наблюдается *сверхтонкая* (мультиплетная) *структура* линий ЯМР. Она возникает вследствие магнитного взаимодействия между ядрами, передаваемого через электроны связи, т. е. непрямого спин-спинового взаимодействия. Так, в $ClH_2C—CHCl_2$ протон группы CH может находиться в двух состояниях — со спином $+^1/_2$ и $-^1/_2$. Поэтому линия протонов соседней группы CH_2 расщепляется на две. В группе CH_2 возможны три неэквивалентных состояния пары протонов: $+^1/_2$, $+^1/_2$; $+^1/_2$, $-^1/_2$ ($-^1/_2$, $+^1/_2$); $-^1/_2$, $-^1/_2$. Линия протона CH испытывает триплетное расщепление (рис. 5.25).

На рис. 5.26 показаны спектры ядерного магнитного резонанса ядер ^{13}C для карбоангидразы *B* крупного рогатого скота при различных значениях pH. Спектры отражают конформационные изменения и взаимодействия атомов.

Изучение химических сдвигов и сверхтонкой структуры дает количественную информацию о расположении и взаимодействиях атомных ядер. Пользуясь приборами высокого разрешения

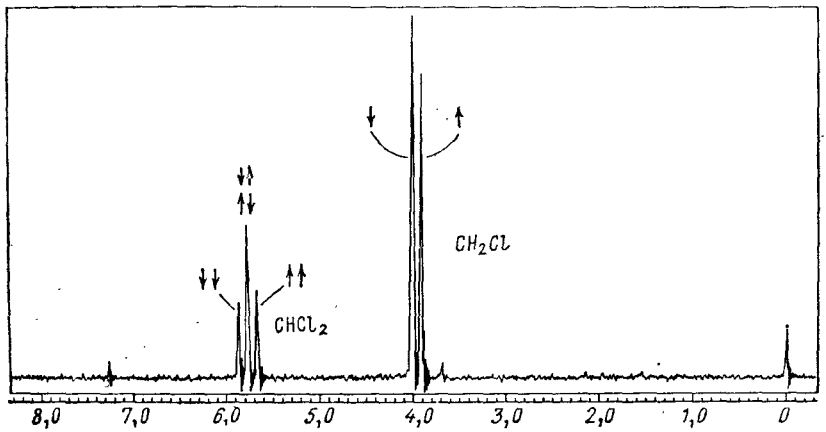


Рис. 5.25. Спектр протонного резонанса $ClH_2C—CHCl_2$. Сверхтонкая структура

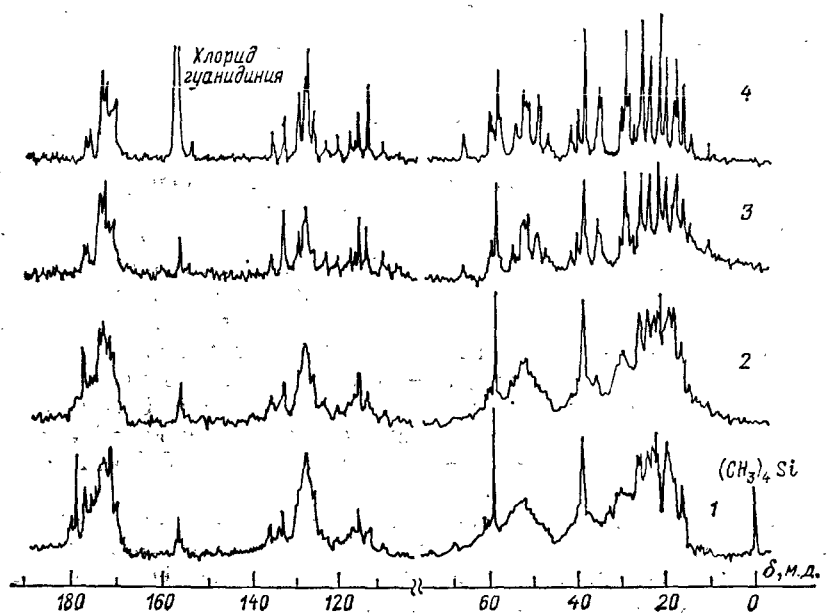


Рис. 5.26. Спектры ЯМР ядер ^{13}C карбоангидразы *B* рогатого скота: *1* — нативная форма pH 5,2; *2* — pH 3,8; *3* — pH 2,1; *4* — денатурированный белок (Липмаа и соавторы).

(сильные сверхпроводниковые магниты, частоты порядка 300 МГц), удается разделить множество перекрывающихся линий протонного резонанса в белках. Здесь существенно и селективное дейтерирование белка. Методы ЯМР были эффективно применены к исследованиям конформационных свойств биополимеров, взаимодействий белков с фармакологическими веществами, взаимодействий фермент — лиганд, антиген — антитело и т. д. Возможности спектроскопии ЯМР в молекулярной биофизике неограниченны.

Методы ЯМР непрерывно совершенствуются. Не имея возможности здесь о них рассказать, укажем лишь, что в стационарном случае эффективным оказывается *двойной резонанс*, существенно упрощающий спектр. На образец подаются сразу два сигнала, разнящихся по частоте соответственно разности химических сдвигов или двух взаимодействующих ядер. Эта так называемая двумерная ЯМР-спектроскопия особенно информативна. Двойной резонанс может сопровождаться так называемым *эффектом Оверхаузера*. Как уже сказано, в настоящее время применяются и импульсные методы.

ЯМР на ^{31}P и ^{13}C эффективно применяется и к изучению живых клеток и тканей. С помощью методов фурье-преобразования возможно отделить слабые сигналы от фона. При этом пользуются мощным радиочастотным импульсом, возбуждающим одновременно целый резонансный спектр, отдельные частоты которого отсортировываются с помощью компьютера. Так были изучены явления в живой мышце — изменения концентрации АТФ и креатин-фосфата при сокращении мышцы (см. § 12.3). Положение пика ^{31}P неорганического фосфата в сердечной мышце зависит от pH и поэтому смещается при кислородной недостаточности. Это открывает принципиальные возможности для применения ЯМР в кардиологии.

Обратимся теперь к ЭПР. Электрон имеет спин $s = 1/2$, его энергетический уровень в поле H_0 расщепляется на два с расстоянием между ними, отвечающим условию резонанса (ср. (5.58))

$$\hbar\omega_0 = g\mu_B H_0, \tag{5.66}$$

где μ_B — магнетон Бора, превышающий ядерный магнетон в 1836 раз:

$$\mu_B = \frac{e\hbar}{2m_e c} = 0{,}93\cdot 10^{-20}\ \text{эрг/Гс}, \tag{5.67}$$

m_e — масса электрона. Для свободного электрона $g = 2{,}0023$. В поле $H_0 = 10^4$ Гс резонансная частота $\nu_e = 2{,}8\cdot 10^{10}\ \text{с}^{-1}$ ($\nu_p = 4{,}26\cdot 10^7\ \text{с}^{-1}$).

В подавляющем большинстве органических соединений спины электронов скомпенсированы и ЭПР отсутствует. ЭПР наблюдается у *свободных радикалов* и у молекул с нечетным числом

электронов. Здесь ЭПР дает важнейшую информацию об электронном строении системы.

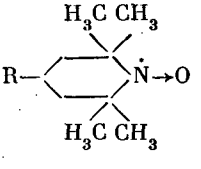
Линии ЭПР испытывают сверхтонкое расщепление вследствие локального поля, создаваемого магнитными моментами ядер. Так, ядро ^{14}N имеет $J = 1$, и, следовательно, проекции ядерного спина на направление поля H_0 отвечают значениям магнитного квантового числа $m = 1, 0, -1$. Локальное поле, действующее на электрон свободного радикала, находящегося вблизи ядра ^{14}N, имеет три значения и пик ЭПР расщепляется в триплет.

Так называемая *тонкая структура* возникает в кристаллах вследствие *анизотропии g-фактора*. Вместо одной линии наблюдается группа линий, положения и интенсивности которых зависят от ориентации поля H_0 относительно кристаллических осей. В жидкости тонкая структура не наблюдается.

Ширина линий в спектре ЭПР определяется, как и в ЯМР, спин-спиновой и спин-решеточной релаксацией. Времена T_1 и T_2 зависят от подвижности частиц с ненулевыми спинами (T_2) и от подвижности окружающих молекул (T_1). Время спин-спиновой релаксации T_2 почти не зависит от температуры и определяется концентрацией парамагнитных частиц. Время T_1 возрастает при понижении температуры.

ЭПР эффективно применяется к решению многих проблем биологии и биофизики. Свободные радикалы образуются в ряде ферментативных окислительно-восстановительных процессов, при воздействии радиации и т. д. ЭПР дает весьма ценную информацию об этих процессах. ЭПР очень важен для изучения белков, содержащих в качестве кофакторов атомы металла с нескомпенсированным спином (гемопротеины, см. § 6.8 и т. д.).

Широко развиты исследования ЭПР биополимеров, основанные на методе *спиновой метки*. К биополимеру присоединяют устойчивый свободный радикал, содержащий неспаренный электрон. Особенно удобны нитроксильные радикалы, как, например,



Спин-метка чувствительна к своему окружению, ее спектр ЭПР зависит от конформационного состояния биополимера. Подвижность метки связана с локальной подвижностью биополимера и подвижностью его молекулы как целого. С помощью спин-меток установлены важные особенности строения и динамики белковых молекул. Эти методы весьма эффективны и при изучении биологических мембран.

Зондирование молекулярной или надмолекулярной биологической системы с помощью спин-меток родственно применению люминесцентных меток (с. 147). Зачастую целесообразно сочетать оба метода.

Глава 6

ФИЗИКА ФЕРМЕНТОВ

§ 6.1. Химическая кинетика и катализ

Важнейшая функция белков — ферментативная. Ферменты служат катализаторами всех биохимических реакций. *Катализатор* ускоряет реакцию, но в реакции не расходуется.

Скорости химических реакций обычно сильно зависят от температуры. Эмпирически эта зависимость выражается формулой Аррениуса для константы скорости реакции (см. с. 19)

$$k = A \exp(-\overset{+}{E}/RT), \tag{6.1}$$

где $\overset{+}{E}$ — *энергия активации* — характеризует энергетический барьер, который должна преодолеть система для осуществления реакции. Зависимость k от $\overset{+}{E}/RT$ следует из распределения Больцмана по энергиям, экспонента указывает на долю молекул, обладающих достаточной для реакции энергией $\overset{+}{E}$. Константы k определяют скорости реакций. В обратимой реакции $\mathrm{A} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} \mathrm{B}$ скорости ([A], [B] — концентрации)

$$\vec{v} = k_1 [\mathrm{A}], \qquad \overleftarrow{v} = k_{-1} [\mathrm{B}]. \tag{6.2}$$

В равновесии $\vec{v} = \overleftarrow{v}$ и константа равновесия

$$K = \frac{[\mathrm{B}]_{\mathrm{eq}}}{[\mathrm{A}]_{\mathrm{eq}}} = \frac{k_1}{k_{-1}}. \tag{6.3}$$

Индекс eq означает равновесную концентрацию. Разность свободных энергий продуктов реакции и исходных реагентов равна

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S, \tag{6.4}$$

где ΔH — разность энтальпий, ΔS — разность энтропий. Реакция возможна, лишь если $\Delta G < 0$, т. е. если свободная энергия понижается. Однако это условие необходимо, но еще недостаточно для реакции. Энергия активации $\overset{+}{E}$ может быть настолько

большой, что константа скорости исчезающе мала и реакция не идет. Катализатор служит для понижения активационного барьера.

Смысл формулы Аррениуса раскрывается в *теории абсолютных скоростей реакций* (теория переходного состояния или активированного комплекса), предложенной Эйрингом.

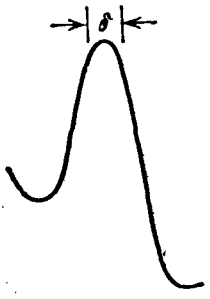


Рис. 6.1. Профиль свободной энергии для химической реакции

Предполагается, что течение реакции не нарушает больцмановского распределения молекул по состояниям с различной энергией. Прохождение реакции требует преодоления энергетического барьера. На рис. 6.1 показан профиль свободной энергии для некоторого процесса: $\Delta G = G_1 - G_2$ — разность свободных энергий начального состояния 1 и конечного состояния 2, G^+ — свободная энергия активации в процессе $1 \to 2$. Найдем число систем, находящихся в некотором интервале δ *реакционной координаты* ξ на вершине барьера. Скорость реакции есть число систем, преодолевающих барьер в единицу времени. Средняя скорость движения системы равна

$$\bar{v} = \frac{\int_0^\infty v \exp(-mv^2/2\kappa T)\, dv}{\int_0^\infty \exp(-mv^2/2\kappa T)\, dv} = \left(\frac{\kappa T}{2\pi m}\right)^{1/2}. \qquad (6.5)$$

Мы воспользовались распределением Максвелла — Больцмана по кинетическим энергиям $mv^2/2$. Скорость реакции, т. е. число переходов через барьер в единицу времени, равна

$$\nu = \frac{c'}{\delta}\bar{v} = \frac{c'}{\delta}\left(\frac{\kappa T}{2\pi m}\right)^{1/2}, \qquad (6.6)$$

где c' — число систем в единице объема, находящихся в пределах отрезка δ. Вместе с тем

$$\nu = k c_A c_B \ldots, \qquad (6.7)$$

где c_A, c_B, ... — концентрации реагентов. Из (6.6) и (6.7) следует, что

$$k = \frac{c'}{c_A c_B \ldots}\left(\frac{\kappa T}{2\pi m}\right)^{1/2}\frac{1}{\delta} = K'\left(\frac{\kappa T}{2\pi m}\right)^{1/2}\frac{1}{\delta}. \qquad (6.8)$$

Здесь K' — константа равновесия для перехода реагентов A, B, ... в активированное состояние. Константа равновесия выражается через статистические суммы

$$Z = \sum_i \exp(-E_i/\kappa T), \qquad (6.9)$$

где E_i — энергия i-го состояния системы. Суммирование проводится по всем состояниям. В нашем случае

$$K' = \frac{Z_{а.к}}{Z_A Z_B \ldots}, \qquad (6.10)$$

где $Z_{а.к}$, Z_A, Z_B, ... — статистические суммы для активированного комплекса (состояния) и реагентов A, B, ... соответственно. Для поступательного движения частицы набор состояний непрерывен, сумма (6.9) заменяется инте-

гралом, который равен

$$Z_{\text{пост}} = \delta^3 (2\pi m\kappa T/h^2)^{3/2}, \tag{6.11}$$

где h — постоянная Планка, m — масса частицы. Мы приняли объем, занимаемый частицей, равным δ^3, $Z_{\text{пост}}$ — статистическая сумма по трем степеням свободы поступательного движения. Но так как система имеет лишь одну такую степень свободы — вдоль направления реакции, мы получаем

$$Z_{\text{а.к}} = Z'_{\text{а.к}} \delta \left(\frac{2\pi m\kappa T}{h^2} \right)^{1/2}, \tag{6.12}$$

где $Z'_{\text{а.к}}$ — статистическая сумма для активированного комплекса по всем степеням свободы, кроме поступательной. Из (6.8), (6.10) и (6.12) получаем

$$k = \frac{\kappa T}{h} \frac{Z'_{\text{а.к}}}{Z_{\text{A}} Z_{\text{B}} \dots}. \tag{6.13}$$

Условная длина δ сократилась. Статистические величины непосредственно связаны с термодинамическими. Имеем

$$Z = \exp(-G/RT), \tag{6.14}$$

и, следовательно,

$$k = \frac{\kappa T}{h} \frac{\exp(-G'/RT)}{\exp(-G_{\text{A}}/RT) \exp(-G_{\text{B}}/RT) \dots} = \frac{\kappa T}{h} \exp\left(- \frac{G' - G_{\text{A}} - G_{\text{B}} - \dots}{RT} \right) =$$

$$= \frac{\kappa T}{h} \exp\left(- \frac{\overset{+}{G}}{RT} \right). \tag{6.15}$$

Здесь $\overset{+}{G}$ — избыток свободной энергии активированного комплекса по сравнению с суммарной свободной энергией реагентов, т. е. *свободная энергия активации.*

При выводе выражения (6.15) предполагается, что достигнув активационного барьера, система обязательно претерпевает химическое превращение. Этого может и не быть. Вводя добавочный множитель — трансмиссионный коэффициент $\varkappa \leqslant 1$, получаем окончательное выражение для константы скорости гомогенной газовой реакции — *формулу Эйринга*:

$$k = \varkappa \frac{\kappa T}{h} \exp\left(\overset{+}{S}/R \right) \exp\left(- \overset{+}{H}/RT \right); \tag{6.16}$$

$\overset{+}{S}$ — энтропия, $\overset{+}{H}$ — энтальпия активации. Значение $\varkappa = 1$ отвечает адиабатическому течению реакции, т. е. процессу, в котором параметры механической системы изменяются медленно. В химической реакции такими параметрами являются положения атомных ядер. При каждой конфигурации ядер электроны движутся так, как если бы ядра оставались неподвижными. Если процесс неадиабатический, $\varkappa \ll 1$ и может принимать значения порядка 10^{-5}. Наблюдаемые в газовых реакциях значения $\varkappa$ большей частью близки к 1, т. е. эти реакции идут адиабатически. Множитель $\kappa T/h$ при обычных температурах имеет порядок 10^{13} с$^{-1}$.

Сравним формулу Эйринга (6.16) с формулой Аррениуса (6.1). Если отождествить энтальпию и энергию активации, то предэкспоненциальный множитель будет равен

$$A = \varkappa \frac{\kappa T}{h} \exp\left(\overset{+}{S}/R\right). \tag{6.17}$$

Значения параметров активации определяют по температурной зависимости k. Имеем при $\varkappa = 1$

$$\ln k = \frac{\overset{+}{S}}{R} + \ln \frac{\kappa T}{h} - \frac{\overset{+}{H}}{RT}. \tag{6.18}$$

Второе слагаемое зависит от T слабо, им можно пренебречь. Получаем линейную зависимость $\ln k$ от $1/T$. По наклону прямой находим $\overset{+}{H}$, по отрезку, отсекаемому на оси ординат, $-\overset{+}{S}$. Нелинейность зависимости $\ln k$ от T^{-1} свидетельствует об усложнении процесса, в частности, о его кооперативности. В таком процессе свободная энергия активации не постоянна, но зависит от числа уже прореагировавших систем и тем самым от T. Представим себе процесс выхода из переполненного автобуса. В начале выйти трудно, для этого нужна большая энергия активации. По мере освобождения автобуса эта энергия убывает. Наглядный пример кооперативной кинетики.

Надо подчеркнуть, что нельзя трактовать $h/\kappa T$ как время существования активированного комплекса. Такая трактовка приводит к противоречию — за 10^{-13}—10^{-14} с не может установиться статистическое равновесие. В действительности время существования системы в состоянии, отвечающем значениям реакционной координаты от ξ до $\xi + \delta$, пропорционально δ. Это время должно трактоваться так же, как время существования состояний, рассматриваемых в теории Максвелла — Больцмана. Из малости $h/\kappa T$ нельзя делать вывод о невозможности установления равновесия между активированным комплексом и реагентами. Термин «активированный комплекс» относится к состояниям атомной системы, испытывающей превращения, и не означает существования метастабильного комплекса, который можно изучать химическими и физическими методами.

Теория Эйринга применима к реакциям в газах, но не в жидкой фазе. Общий метод качественного рассмотрения на основе этой теории пригоден для различных кинетических процессов (вязкое течение, диффузия, ср. § 12.4).

В ряде случаев реакция идет без преодоления активационного барьера посредством *туннельного эффекта*, квантовомеханического «просачивания» сквозь барьер. Это имеет место, в частности, в реакциях переноса электрона или протона (ср. § 13.4). В этом случае скорость реакции практически не зависит от температуры.

Обратимся к катализу. Как уже сказано, роль катализатора состоит в снижении свободной энергии активации, и, следовательно, в увеличении константы скорости реакции. Нужно различать *гетерогенный* и *гомогенный катализ*. В первом случае катализатор образует отдельную фазу, и реакция протекает на поверхности раздела фаз. Процесс начинается с *адсорбции* реагентов на этой поверхности, скажем, на поверхности твердого катализатора, ускоряющего реакцию в газе или в жидкости. Адсорбция сопровождается изменением электронной структуры реагентов и понижением свободной энергии активации. После прохождения реакции продукты десорбируются с поверхности. При гомогенном катализе катализатор и реагенты находятся в одной фазе, например в растворе. Катализатор образует промежуточное соединение с реагентами, далее распадающееся на катализатор и продукты реакции.

Ферменты функционируют либо в растворах, либо в надмолекулярных структурах. Сорбция реагентов, именуемых *субстратами*, и реакция протекают на некоторой поверхности большой молекулы белка. В этом смысле ферментативный катализ сходен с гетерогенным. Однако белок-фермент и малые молекулы субстратов находятся в одной фазе в растворе. Имеется строгая стехиометрия взаимодействия — как правило, одна белковая глобула взаимодействует с одной молекулой субстрата или другого лиганда. При взаимодействии образуется *фермент-субстратный комплекс* (ФСК), строение и свойства которого изучаются физическими и химическими методами. Ферментативный катализ в растворе — гомогенный катализ.

Можно рассматривать фермент как «черный ящик», преобразующий входной сигнал — молекулу субстрата в выходной сигнал — молекулу *продукта*. Имеются два способа для исследования устройства и механизма работы «черного ящика»: изучение молекулярной структуры фермента и ФСК и изучение кинетики ферментативных реакций.

§ 6.2. Кинетика простых ферментативных реакций

Рассмотрим простейшую ферментативную реакцию превращения субстрата в продукт в одностадийном процессе

$$F_0 + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} F_1 \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} F_0 + P.$$

Здесь F_0 — свободный фермент, S — субстрат, F_1 — ФСК, P — продукт. У стрелок указаны константы скорости реакций. Положим, для простоты, что можно пренебречь k_{-2} — обратной реакцией. Кинетические уравнения имеют вид (здесь F_1, S, P — концентрации)

$$\begin{aligned} \dot{S} &= -k_1 F_0 S + k_{-1} F_1, \\ \dot{F}_1 &= k_1 F_0 S - (k_{-1} + k_2) F_1, \\ \dot{P} &= -\dot{S} = k_2 F_1. \end{aligned} \tag{6.19}$$

Общая концентрация фермента постоянна

$$F_0 + F_1 = E = \text{const}. \tag{6.20}$$

Исключая из второго уравнения (6.19) F_0 с помощью (6.20), получим

$$\dot{F}_1 = k_1 ES - (k_{-1} + k_2 + k_1 S) F_1. \tag{6.21}$$

Система находится в стационарном состоянии, если имеется большой избыток субстрата, $S \gg E$. Пока сохраняется стационарное состояние, $\dot{F}_1 = 0$ (и, конечно, $\dot{F}_0 = 0$). Поясним это наглядным примером. Нужно завязать ботинки. Это можно быстрее сделать, поставив ногу на стул, который тем самым играет роль катализатора. Субстрат — незавязанный ботинок, продукт — завязанный, свободный фермент — свободный стул, ФСК — нога; поставленная на стул. Если завязать ботинки нужно большому числу людей (скажем, матросам по тревоге), а число стульев невелико, то число стульев, на которые поставлены ноги, будет в течение некоторого времени постоянным.

Итак, в стационарном состоянии $\dot{F}_1 = 0$ и из (6.21) получаем

$$F_1 = \frac{k_1 ES}{k_{-1} + k_2 + k_1 S}. \tag{6.22}$$

Из (6.19) следует, что

$$v = \dot{P} = -\dot{S} = k_2 F_1 = \frac{k_1 k_2 SE}{k_{-1} + k_2 + k_1 S}, \tag{6.23}$$

v — скорость реакции. Поделив числитель и знаменатель на k_1, получаем *уравнение Михаэлиса — Ментен*:

$$v = \frac{k_2 SE}{K_M + S}, \tag{6.24}$$

где *константа Михаэлиса*

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}. \tag{6.25}$$

Прежде чем рассмотреть это уравнение, докажем, что стационарное состояние действительно реализуется при $S \gg E$. Проинтегрируем уравнение (6.21), считая S практически постоянным, т. е. рассматривая S как медленно изменяющийся параметр. В момент $t = 0$ добавления фермента к субстрату $F_1(0) = 0$ (весь фермент свободен). Получаем

$$F_1 = \frac{k_1 ES}{k_{-1} + k_2 + k_1 S} (1 - e^{-t/\tau}), \tag{6.26}$$

где

$$\tau = (k_{-1} + k_2 + k_1 S)^{-1}.$$

ФСК F_2 релаксирует к стационарному значению, отвечающему $\dot{F}_1 = 0$, с временной постоянной τ тем быстрее, чем больше концентрация субстрата S. Из (6.26) следует, что

$$\dot{F}_1 = k_1 ES \exp(-t/\tau) \to 0. \tag{6.27}$$

Подставляя значения F_1 (6.26) и $\dot{F}_1$ (6.27) в первое уравнение (6.19),

находим

$$\dot{S} = -k_1 ES \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) - \frac{k_1 k_2 ES}{k_{-1} + k_2 + k_1 S}\left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)\right], \quad (6.28)$$

т. е. при $t \to \infty$ величина $\dot{S}$ действительно стремится к стационарному значению (6.23). Это связано с исходным предположением о медленном изменении S. Относительная скорость изменения S действительно мала при $S \gg E$. Величина $\dot{S}$ монотонно убывает во времени, ее максимальное значение отвечает начальному моменту $t = 0$:

$$\dot{S}(0) = -k_1 ES.$$

Максимальной мерой изменения S поэтому является

$$\Delta S \approx \dot{S}(0)\,\tau = -\frac{k_1 ES}{k_{-1} + k_2 + k_1 S}. \quad (6.29)$$

Легко видеть, что при $E \ll S$

$$|\Delta S| \ll S.$$

Вместе с тем $\Delta F_1 \approx \dot{F}_1(0)\tau \approx -\Delta S$ и $\Delta F_1/E \gg |\Delta S|/S$.

Вернемся к уравнению Михаэлиса — Ментен (6.24). Зависимость $v(S)$ подобна изотерме Ленгмюра (рис. 6.2). Кривая не имеет особенностей, скорость реакции асимптотически стремится к своему наибольшему значению при $S \to \infty$:

$$v_{\max} = k_2 E. \quad (6.30)$$

Следовательно,

$$v = \frac{v_{\max} S}{K_M + S}. \quad (6.31)$$

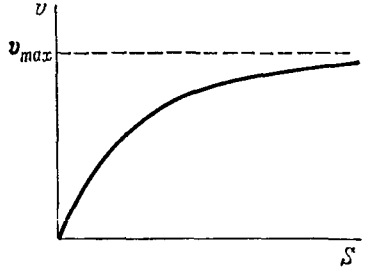


Рис. 6.2. Кривая Михаэлиса — Ментен

При $v = 0{,}5\, v_{\max}$ имеем $S = K_M$, т. е. константа Михаэлиса есть концентрация субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимальной.

Уравнение (6.31) удобно преобразовать по Лайнуиверу и Бэрку:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}}\frac{1}{S} + \frac{1}{v_{\max}}. \quad (6.32)$$

Строя график зависимости $1/v$ от $1/S$, находим $1/v_{\max}$ по точке пересечения прямой с осью ординат и K_M по наклону прямой. Константу Михаэлиса можно представить в виде

$$K_M = k_2/k_1 + K_S, \quad \text{где} \quad K_S = k_{-1}/k_1.$$

Все три константы скорости можно определить, представив (6.32) с помощью (6.30) в виде

$$\frac{v_{\max}}{v} - 1 = \frac{K_S}{S} + \frac{v_{\max}}{k_1 ES}. \quad (6.33)$$

При данном значении S зависимость $v_{max}/v - 1$ от v_{max} изображается прямой линией, отсекающей на оси ординат отрезок K_s/S, а на оси абсцисс отрезок $-1/k_1ES$. Из прямых, полученных при разных значениях S и E, можно найти k_1, k_{-1}, k_2.

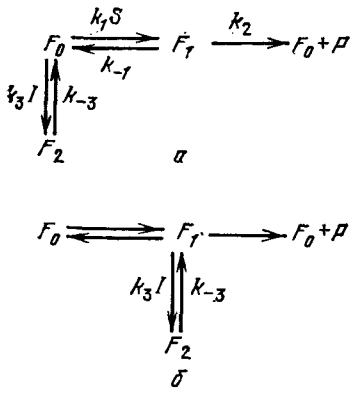


Рис. 6.3. Схемы процессов с конкурентным (*а*) и неконкурентным (*б*) ингибированием

Рассмотрим теперь такую же реакцию при наличии модификатора — вещества, вызывающего изменение скорости реакции. Если модификатор замедляет реакцию, то он называется *ингибитором*, в противном случае — *активатором*. Обозначим концентрацию ингибитора через I. На рис. 6.3 представлены графические схемы (*графы*) для двух простейших случаев ингибирования. При *конкурентном ингибировании* фермент, наряду с ФСК, образует неактивный комплекс с I, обозначаемый F_2. Ингибитор конкурирует с субстратом, связываясь с активным центром фермента. При *неконкурентном ингибировании* комплекс F_2 образуется при взаимодействии ФСК F_1 с I.

Уравнения стационарной кинетики при $S \gg E$, $I \gg E$ в первом случае имеют вид

$$\begin{aligned} \dot{F}_0 &= -(k_1S + k_3I)F_0 + (k_{-1} + k_2)F_1 + k_{-3}F_2 = 0,\\ \dot{F}_1 &= k_1SF_0 - (k_{-1} + k_2)F_1 = 0,\\ \dot{F}_2 &= k_3IF_0 - k_{-3}F_2 = 0,\\ E &= F_0 + F_1 + F_2, \quad v = k_2F_1. \end{aligned} \tag{6.34}$$

Их решение имеет вид

$$F_1 = \frac{k_1S}{k_{-1} + k_2}F_0, \quad F_2 = \frac{k_3I}{k_{-3}}F_0, \quad E = \left(1 + \frac{k_1S}{k_{-1} + k_2} + \frac{k_3I}{k_{-3}}\right)F_0,$$

и, следовательно,

$$v = \frac{k_2k_1S}{k_{-1} + k_2}F_0 = \frac{k_2SE}{K_M + S + K_MK_II}, \tag{6.35}$$

где $K_I = k_3/k_{-3}$. Максимальная скорость $v_{max} = k_2E$ не меняется, но скорость при малых S убывает.

При неконкурентном ингибировании

$$\begin{aligned} \dot{F}_0 &= -k_1SF_0 + (k_{-1} + k_2)F_1 = 0,\\ \dot{F}_1 &= k_1SF_0 - (k_{-1} + k_2 + k_3I)F_1 + k_{-3}F_2 = 0,\\ \dot{F}_2 &= k_3IF_1 - k_{-3}F_2 = 0,\\ E &= F_0 + F_1 + F_2, \quad v = k_2F_1. \end{aligned} \tag{6.36}$$

Решение имеет вид

$$v = \frac{k_2 SE}{K_M + S + K_I SI}. \qquad (6.37)$$

При этом уменьшается максимальная скорость

$$v_{max} = \frac{k_2 E}{1 + k_I I}. \qquad (6.38)$$

На практике зачастую ситуация более сложна.

В нестационарных системах решение даже простых кинетических задач требует применения ЭВМ. Числовые решения дают

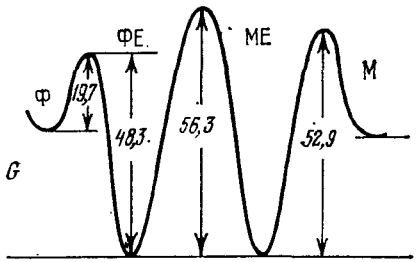


Рис. 6.4. Кривая свободной энергии для реакции Ф ⇌ М (фумарат ⇌ малат). ФЕ, МЕ — комплексы с ферментами. Числа — энергия G в кДж/моль

более богатую информацию о константах скорости, необходимую в сложных случаях.

В действительности даже в простых случаях превращение субстрата в продукт протекает в несколько стадий:

$$E + S \underset{\text{Десорбция}}{\overset{\text{Сорбция}}{\rightleftarrows}} ES \underset{\text{Обратное превращение}}{\overset{\text{Превращение}}{\rightleftarrows}} EP \underset{\text{Сорбция}}{\overset{\text{Десорбция}}{\rightleftarrows}} E + P.$$

Здесь E есть F_0, ES ⇌ EP мы ранее обозначили через F_1. Исследование зависимости констант скорости от температуры позволяет определять эффективные значения свободной энергии, энтальпии и энтропии активации. Реакция имеет сложный профиль для этих величин (рис. 6.4). Они были определены для многих процессов, причем выяснилась большая роль энтропийного вклада. Для G^+ ферментативных реакций характерны величины порядка 40—80 кДж/моль, для H^+ — того же порядка, для S^+ — 40—160 Дж/(моль · К). Напомним, что при 300 К 140 Дж/(моль · К) дают вклад в свободную энергию, равный 42 кДж/моль. Установлен так называемый *компенсационный эффект*. Изменения энтальпии ΔH в процессах, протекающих в водных растворах, зачастую пропорциональны изменениям энтропии ΔS. То же относится к активационным параметрам: H^+ пропорционально S^+. Ламри предположил, что этот эффект определяется свойствами воды: изменение конформации белка, сопровождаемое вытеснением воды из активной полости глобулы, вызывает перестройку

окружающей водной структуры. Компенсационный эффект может быть важен для теплокровных организмов. Малость изменений ΔG и G^{+} вследствие компенсации означает малую чувствительность ферментативных процессов к температурным изменениям в окружающей среде.

Однако значения G^{+}, H^{+} и S^{+} для ферментативных реакций условны. Кинетические измерения можно вести лишь в узком температурном интервале. Активационные параметры сильно зависят от ионного состава среды, от pH и т. д. При этом уравнение Аррениуса может не выполняться, так как глобула испытывает структурные перестройки, зависящие от температуры. Указанная интерпретация компенсационного эффекта может оказаться иллюзорной. Эти вопросы остаются пока открытыми.

Существенная зависимость ферментативной активности от pH среды определяется полиэлектролитной природой фермента. Ферментативная активность, характеризуемая, в частности, константой k_2, зависит от pH колоколообразно — k_2 имеет максимум при некотором значении pH и убывает при уменьшении или увеличении pH. Предложен ряд теоретических моделей, объясняющих в общих чертах такую зависимость. Подлинная теория требует, однако, более подробных сведений о ферментах, чем нам пока известные.

§ 6.3. Химические аспекты действия ферментов

Характерные особенности ферментативного катализа — большая активность и строгая специфичность по отношению к субстрату или группе субстратов.

Молекулярной активностью или *числом оборотов* фермента называется число молей субстрата, превращаемых в одну минуту одним молем фермента при значительном избытке субстрата, $S \gg E$. Свойства ферментов изучаются *in vitro*. Многие ферменты получены в кристаллической форме.

Субстраты — малые молекулы или малые группы больших молекул. Напротив, фермент макромолекулярен. Следовательно, субстрат непосредственно взаимодействует с определенным малым участком молекулы фермента — с ее *активным центром*. Природа активного центра, т. е. совокупность и расположение аминокислотных остатков, а также *кофакторов* (см. с. 48), входящих в его состав, установлена для ряда ферментов. Мы уже упоминали о фермент-субстратном узнавании (с. 58). Изменения активности, возникающие в результате химической модификации белка, позволяют выявить функциональные группы активного центра. Сведения о его структуре дают оптические и спектральные методы, а также рентгеноструктурный анализ комплексов фермента с конкурентными ингибиторами, строение которых близко к строению субстратов.

Разнообразие аминокислотных остатков фермента и атомных групп кофактора определяет полифункциональность активного центра — его способность связывать субстрат и каталитическую активность. Ферментативная реакция многостадийна, протекает через ряд химических превращений. Так, у *эстераз* в активном центре присутствует Сер, подвергающийся ацилированию на

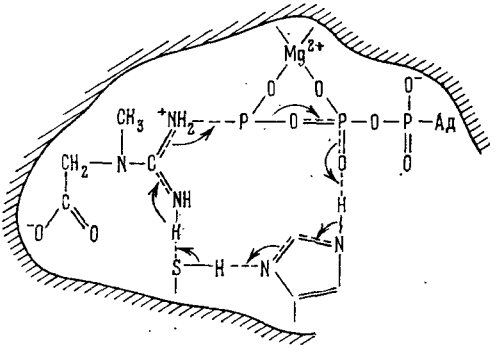


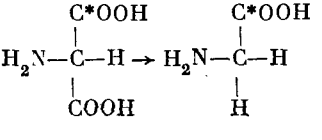
Рис. 6.5. Схема действия креатинкиназы. Переходные состояния

промежуточной стадии процесса. На субстрат действуют согласованно различные группы активного центра. Приведем пример *креатинкиназы*, катализирующей реакцию

$$АТФ^{4-} + креатин \rightleftharpoons АДФ^{3-} + фосфокреатин^{2-} + H^+.$$

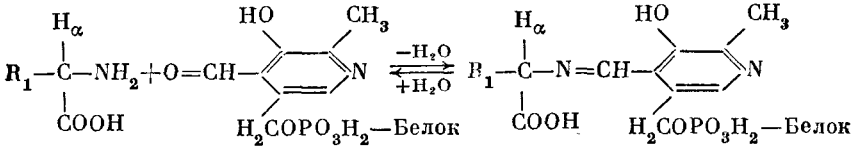
На рис. 6.5 изображена схема переходного состояния для этой реакции. Кофактором служит ион Mg^{2+}. Особенно важную роль в активном центре играет SH-группа. Фермент инактивируется йодацетамидом и йодацетатом. В присутствии Mg^{2+} и обоих субстратов SH-группа защищена от действия блокирующих агентов. По-видимому, SH-группа соединена водородной связью с одной из основных групп фермента. Благодаря легкому переходу протона в системе кислота — основание, соединенных водородной связью, такая система обладает высокой каталитической активностью. На рис. 6.5 показаны сдвиги электронов в субстратах и группах активного центра.

При образовании ФСК существенна точная взаимная ориентация функциональных групп фермента и субстрата или модификатора. Активный центр, естественно, хирален и, тем самым, стереоспецифичен. С помощью меченых атомов установлено, что реакции молекул типа CAABD происходят на поверхности фермента асимметрично. Это относится, например, к превращению аминомалоновой кислоты в глицин

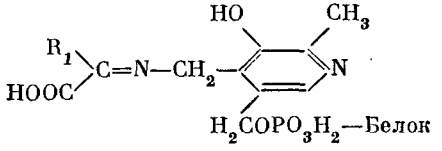


Здесь C* — меченый атом углерода. В реакцию вступает только одна группа COOH, химически и геометрически неотличимая от другой. Это объясняется асимметрией активного центра. Так как группы фермента, связывающиеся с карбоксилами, различны, то неодинаковы и реакции карбоксилов. Ферменты хорошо различают стереоизомеры, и оптический антипод данного субстрата субстратом уже не является.

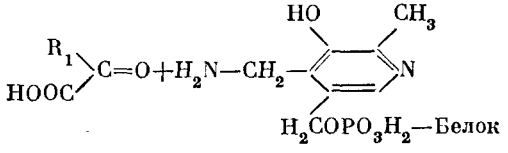
Прямое рентгенографическое исследование комплексов *лизоцима* с ингибирующими аналогами субстратов — полисахаридов — показало, что лиганд внедряется в полость, существующую в глобуле лизоцима, и контактирует с несколькими функциональными группами фермента (Филлипс). Структура такого комплекса показана на рис. 6.6. Внедрение субстрата установлено и для других систем. Для ряда ферментов подробно изучена последовательность химических превращений, т. е. стадий реакции, протекающей в активном центре ФСК. Так, Браунштейн и его сотрудники исследовали химию *аспартат-аминотрансферазы* (ААТ). Этот фермент содержит *пиридоксальфосфат* (ПАЛФ) в качестве кофермента. ПАЛФ, присоединенный к белку, реагирует с субстратом — аминокислотой — химически, образуя *альдимин* (*шиффово основание*)



Атом H_α легко диссоциирует в альдимине. При реакциях переаминирования альдимин таутомеризуется в кетимин



который гидролизуется водой с образованием кетокислоты



Возникает пиридоксаминная форма фермента, реагирующая с другой кетокислотой, содержащей R_2 вместо R_1, причем регенерируется исходный фермент и получается новая аминокислота $R_2CH(COOH)NH_2$. Такова схема реакции *трансаминирования* — переноса аминогруппы.

Практически все реакции, катализируемые ферментами, могут протекать и без ферментов, но с гораздо меньшей скоростью.

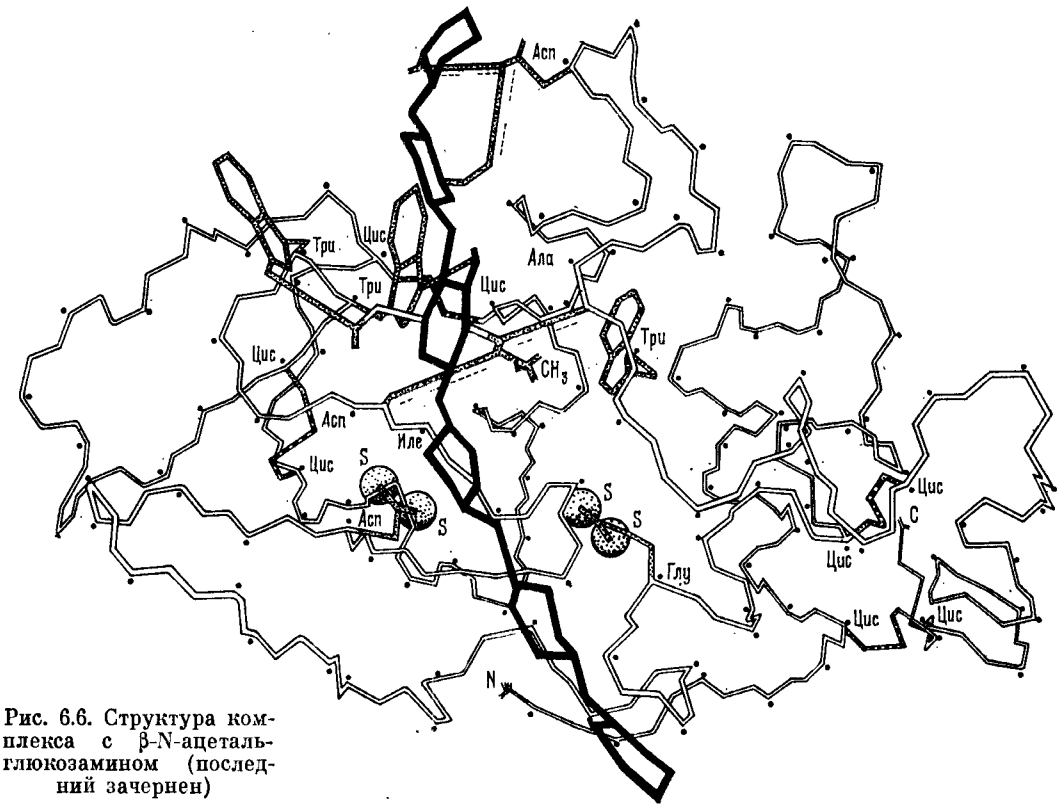


Рис. 6.6. Структура комплекса с β-N-ацетил-глюкозамином (последний зачернен)

Поэтому можно моделировать стадии ферментативного процесса в низкомолекулярных «*конгруэнтных системах*».

Такая модель для реакции, катализируемой ААТ, была построена Ивановым и Карпейским. Первая стадия процесса состоит в слабом связывании аминокислоты активным центром. Вторая стадия — нуклеофильное присоединение аминогруппы субстрата к связи $N{=}C\diagdown$ альдимина. Акцептором протона NH_2-группы здесь является отрицательно заряженная фенольная группа кофермента. Таким образом, неионизованная нуклеофильная аминогруппа оказывается рядом с высокореактивной катионной формой кофермента. С помощью пространственных молекулярных моделей построена структура альдиминной формы ФСК. Далее происходят уже указанные превращения, причем в некоторых стадиях реализуются конформационные движения — повороты коферментного цикла. Схема последовательных событий в активном центре ААТ показана на рис. 6.7, повороты кофермента отмечены круговой стрелкой. Многоточечное связывание в активном центре является причиной стабилизации активной электронной конфигурации, термодинамически невыгодной в растворе, и причиной надлежащей ориентации взаимодействующих групп. В каждой стадии процесса происходит структурная перестройка, обеспечивающая оптимальность последующей стадии. На языке термодинамики это означает, что в активном центре происходит выравнивание уровней свободной энергии промежуточных соединений. Действительно, в спектре поглощения ФСК содержатся полосы поглощения всех важнейших промежуточных соединений реакции, в то время как в соответствующей конгруэнтной системе наблюдается лишь одна полоса 330 нм.

Мы остановились на этих примерах, чтобы показать возможности расшифровки взаимодействий между активным центром фермента и лигандами. Химия выявляет поведение функциональных групп фермента и кофакторов. Однако этого недостаточно для количественного объяснения ферментативной активности, характеризуемой понижением энергии активации. Для ферментативного катализа необходима вся белковая глобула. Нельзя отрезать часть белковой цепи без ущерба для активности фермента. Химия не отвечает на вопрос о роли глобулярной структуры, описывая лишь события в активном центре. Эти задачи стоят перед физикой.

Суммируя результаты химических исследований ферментов, Брауншгейн указал качественные факторы, ответственные за их действие.

1. Большое сродство фермента и субстрата, т. е. большая вероятность образования ФСК, эквивалентная резкому увеличению концентрации реагентов (*эффект сближения*).

2. Строгая взаимная ориентация реагентов, кофакторов и активного центра (*эффект ориентации*). В обычных гомогенных

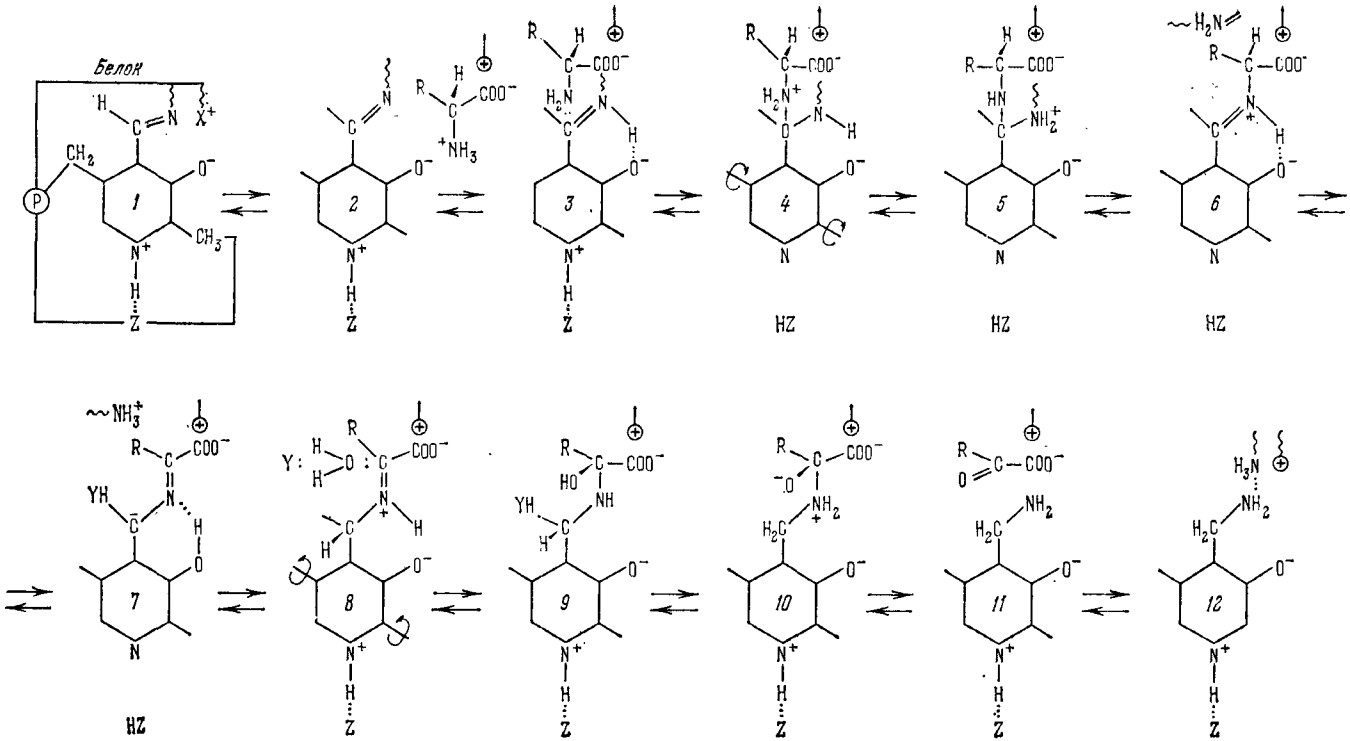
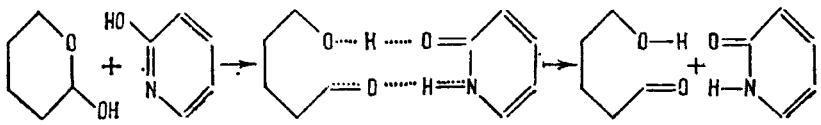


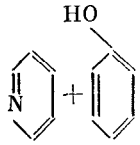
Рис. 6.7. Схема последовательных событий в активном центре ААТ

реакциях вероятность строгой взаимной ориентации трех или большего числа взаимодействующих молекул очень мала.

3. Воздействие на субстрат нуклеофильных и электрофильных групп активного центра (*эффект синхронного кислотно-основного катализа*). Поясним этот эффект на модели. Оксипиридин катализирует *мутаротацию* глюкозы, разрывая ее шестичленное кольцо и испытывая таутомерное превращение:



Такая же реакция с участием смеси пиридина и фенола



протекает в 7000 раз медленнее. Кооперация кислотных и основных групп, их совместное действие резко ускоряют реакцию.

Таблица 6.1. Сравнение скоростей ферментативных реакций со скоростями неферментативных аналогов

Фермент	Неферментативный аналог	Скорость ферментативного процесса v, $с^{-1}$	Скорость неферментативного процесса v_0, $с^{-1}$	$\frac{v}{v_0}$
Лизоцим	Гидролиз ацеталя, основный катализ	$5 \cdot 10^{-1}$	$3 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{8}$
Химотрипсин	Гидролиз амида, основный катализ	$4 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{3}$
β-амилаза	Гидролиз ацеталя, основный Катализ	$1 \cdot 10^{3}$	$3 \cdot 10^{-9}$	$3 \cdot 10^{11}$
Фумараза	Гидрирование алкена, кислотный и основный катализ	$5 \cdot 10^{2}$	$3 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{11}$

Скорости неферментативных реакций умножены здесь на коэффициент, отвечающий эффекту сближения. Для двух молекул, имеющих размеры молекулы H_2O, этот множитель равен 55, т. е. равен молярной концентрации воды.

4. Активация субстрата путем перераспределения электронной плотности под действием активных групп фермента (*эффект поляризации*).

5. Изменение конформаций белка и субстрата в ФСК (*эффект индуцированного контакта*).

Физика должна рассмотреть эту картину количественно, выявив попутно, в какой мере возможно разделение указанных эффектов.

Приведем в заключение данные, характеризующие скорости ферментативных и аналогичных неферментативных процессов (табл. 6.1).

§ 6.4. Конформационные свойства ферментов

Для понимания ферментативной активности необходимо рассмотреть конформационное поведение макромолекулы белка. Конформационная лабильность белка обеспечивает возможность его специфического взаимодействия с субстратами и другими лигандами. В некоторых конформациях белок более эффективно связывает субстрат. Одновременно происходит отбор конформаций субстрата. В ФСК отбираются те конформации белка и субстрата, которые находятся в *структурном соответствии* друг с другом, обеспечивающем оптимальное значение свободной энергии взаимодействия. При образовании ФСК происходит взаимная «подгонка» конформаций белка и субстрата, т. е. их специфический отбор. Посредством конформационных превращений реализуется структурное соответствие фермента и субстрата.

Конформационные эффекты определяют значительные изменения энтропии при образовании ФСК. Понижение энтропии при отборе определенной конформации может компенсироваться понижением энтальпии. Физический анализ событий такого типа требует учета явлений в окружающей водной среде.

В свое время Фишер предложил *модель «ключ — замок»* для рассмотрения фермент-субстратного взаимодействия. Фермент и субстрат обладают жесткими структурами, причем фермент «подогнан» к субстрату как замок к ключу. Ряд фактов противоречит такой модели — взаимодействие фермента с субстратом имеет, по-видимому, не статический, а динамический характер. Кошланд предложил модельную теорию *индуцированного структурного соответствия* фермента и субстрата. Перечислим исходные положения этой теории, задачи которой состояли прежде всего в объяснении специфичности ферментов, катализирующих реакции переноса связи

$$B - X + Y \rightleftharpoons B - Y + X.$$

1. Субстрат вызывает изменение геометрии фермента при своем проникновении в активный центр.

2. Для ферментативного действия необходима надлежащая взаимная ориентация каталитических групп.

3. Субстрат индуцирует такую ориентацию изменениями, которые он вызывает в геометрии фермента.

Конечно, эта теория охватывает и те случаи, в которых изменяется конформация субстрата, а не фермента, или изменяются конформации и того, и другого. Основная идея теории со-

стоит в определяющей роли конформационной лабильности взаимодействующих молекул для ферментативного катализа.

Ряд фактов действительно свидетельствует о конформационных превращениях ферментов при их взаимодействиях с субстратами. В присутствии субстратов некоторые ферменты становятся более жесткими, другие, напротив, более лабильными — легче денатурируются при нагревании. Субстраты индуцируют диссоциацию *глутаматдегидрогеназы* и *гексокиназы* на субъединицы. Под действием субстрата изменяется реакционная способность аминокислотных остатков фермента. Спектр поглощения *химотрипсина* меняется при его взаимодействии с субстратом и эти изменения могут быть интерпретированы как вызванные изменением конформации. Изменения конформаций проявляются и в спектрах люминесценции как ароматических аминокислотных остатков, так и сорбированных на белке красителей. Методами спектрополяриметрии установлены изменения α-спиральности, возникающие при взаимодействиях ферментов с субстратами, коферментами и другими лигандами. Сведения о конформационных изменениях в ФСК дают также спектры ЭПР ферментов, содержащих парамагнитные метки, спектры ЯМР и т. д.

Рентгенография фермент-субстратных комплексов дает прямую информацию о конформационных превращениях. При вхождении субстрата в полость *лизоцима* (с. 185) полость сужается и более плотно «зажимает» субстрат. Смещения аминокислотных остатков белка невелики, но заметны — остаток Трп 62 смещается на 0,075 нм. Одновременно происходит изменение конформации аналога субстрата — небольшой поворот углеводных колец вокруг гликозидной связи.

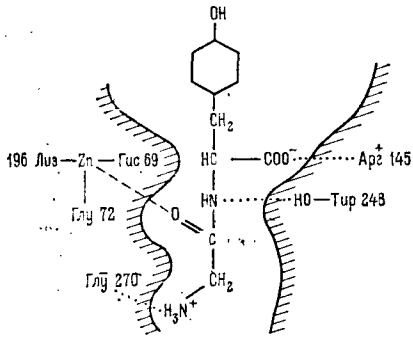


Рис. 6.8. Схема активного центра карбоксипептидазы

Наличие предуготовленной для субстрата полости обнаружено рентгенографически и у других ферментов. При этом выявляются группы активного центра. Прямое подтверждение идеи об индуцированном структурном соответствии получено при исследовании *карбоксипептидазы*. В присутствии аналога субстрата глицилтирозина расположение остатков существенно меняется. Активный центр представляет собой глубокую полость, подобную «рту паука» со «щупальцами», готовыми направить субстрат к кофактору — к атому Zn. Одно «щупальце», содержащее Тир 248, направляется к NH-группе субстрата, Арг 145 другого взаимодействует с карбоксилом субстрата, Глу 270 третьего — с конечной аминогруппой (рис. 6.8).

Как уже указывалось (с. 134), рентгеноструктурный анализ позволил недавно определить относительную подвижность (конформационную и колебательную) различных аминокислотных остатков в белках. Исследования метмиоглобина и лизоцима показали, что остатки, расположенные внутри глобулы, имеют значительно меньшую подвижность, чем расположенные на ее поверхности.

Методы рентгенодинамического анализа, мёссбауэровской спектроскопии, рэлеевского рассеяния мёссбауэровского излучения (§ 5.1, 5.3) и другие показывают, что конформационная

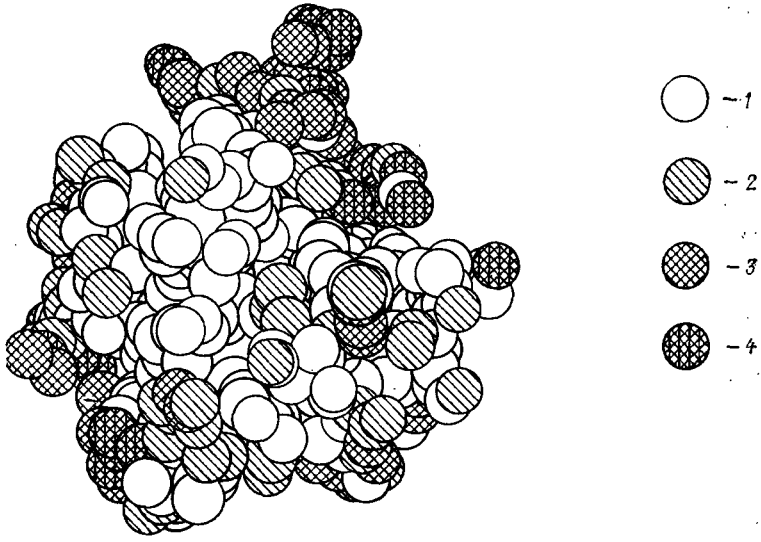


Рис. 6.9. Атомная модель молекулы рибонуклеазы C_2 из *Aspergillus clavatus* по данным рентгеноструктурного анализа с разрешением 1,55 Å. Различной штриховкой показаны атомы, имеющие различную подвижность — средние квадратичные смещения $\langle u \rangle$: *1* — $\langle u \rangle < 0{,}5$ Å; *2* — $0{,}5$ Å $< \langle u \rangle < 0{,}6$ Å; *3* — $0{,}6$ Å $< \langle u \rangle < 0{,}7$ Å; *4* — $\langle u \rangle > 0{,}7$ Å. Значения $\langle u \rangle$ для атомов, входящих в α-спирали и β-формы, заметно ниже, чем для атомов в нерегулярных участках

подвижность сохраняется в белках и при низких температурах. Происходят ли эти движения вблизи положения равновесия или конформационная структура глобулы неравновесна, «застеклована»? По-видимому, возможны оба случая. В отличие от стеклообразных полимеров, высота и положение пика теплоемкости на кривой плавления белка большей частью не зависят от скорости нагревания, что свидетельствует в пользу равновесия. Известны, однако, и противоположные случаи.

На рис. 6.9 показана рентгенодинамическая картина, полученная Поляковым в Институте кристаллографии АН СССР для рибонуклеазы.

Итак, в ФСК достигается структурное соответствие, реализуемое в полости молекулы фермента. Как показывает сопоставление всех изученных рентгенографически структур, их общая особенность состоит в том, что внутренняя поверхность полости образована преимущественно неполярными остатками. Вследствие гидрофобных взаимодействий полярные остатки выведены наружу. Неполярное «нутро» белковой молекулы имеет малую диэлектрическую проницаемость, что облегчает электрические взаимодействия. Фермент является не только специфическим реагентом, но и средой реакции. Перутц писал: «Мы можем спросить себя, почему химические реакции, нормально требующие мощных органических растворителей или сильных кислот и оснований, могут протекать в водном растворе вблизи нейтрального pH в присутствии ферментных катализаторов. Органические растворители имеют преимущества по сравнению с водой, обеспечивая среду с низкой диэлектрической проницаемостью, в которой могут иметь место сильные электрические взаимодействия между реагентами. Неполярные внутренние области ферментов обеспечивают живую клетку эквивалентами органических растворителей, применяемых химиками».

Все эти представления имеют модельный, качественный характер и сами по себе не означают построения физической теории ферментативного катализа. Пути, ведущие к такой, еще не созданной теории, описаны далее.

§ 6.5. Физика фермент-субстратного взаимодействия

Физическое своеобразие ферментативного катализа определяется прежде всего ролью глобулы, размеры которой на порядок больше размеров субстрата. Естественно возникает вопрос о причинах большой эффективности именно такой системы при осуществлении химического превращения в водной среде, при нормальном давлении и физиологической температуре.

При сорбции активным центром молекула субстрата переходит из водного окружения в окружение, созданное аминокислотными остатками. Субстрат оказывается в окружении с малой диэлектрической проницаемостью, в котором могут осуществиться сильные электрические взаимодействия между реагентами и полярными группами фермента. Развивая идею «фермент — растворитель», Перутц приходит к заключению о том, что электростатические взаимодействия дают главный вклад в энергетику ферментативного катализа, т. е. в понижение энергии активации, вызываемое ферментом. Отличие фермента от водного раствора состоит в том, что в активном центре фермента располагаются диполи с фиксированной ориентацией по отношению к заряженным группам субстрата, даже если поле этих зарядов мало. Вследствие такой ориентации ферменты могут стабилизировать пары ионов и другие распределения зарядов значительно больше, чем вода. В водных растворах электростатическое притяже-

ние невелико, так как любая сила, создаваемая сближением противоположных зарядов, уравновешивается переориентацией диполей растворителя. В ферментах такая переориентация невозможна. Проведенные на этой основе количественные расчеты для лизоцима позволили оценить снижение энергии активации катализируемой реакции в согласии с опытом (Варшел).

Белковая глобула представляет собой динамическую систему. Имеется ряд заслуживающих внимания попыток физического истолкования поведения такой системы при ее взаимодействии с субстратом.

Очевидно, что энергия, которую фермент может израсходовать на ускорение реакции (т. е. на эффективное понижение активационного барьера), может иметь единственное происхождение — это часть свободной энергии, выделяемой при сорбции субстрата на ферменте. Предположение о накоплении тепловой энергии окружающей среды в ферменте и ее использовании в реакции означало бы вечный двигатель второго рода. Итак, энергия выделяется при сорбции субстрата. Была предложена гипотеза, согласно которой эта энергия трансформируется в энергию упругих колебаний глобулы, ведущей себя подобно капле жидкости. Частоты таких колебаний попадают в гиперзвуковую область — до 10^{13} $с^{-1}$. Стоячие волны в капле могут образовать пучность в области активного центра и энергия упругих колебаний может активировать молекулу субстрата. Количественные оценки, основанные на этой идее, показали, что энергия упругих колебаний глобулы действительно может достигать 20—40 кДж/моль и обеспечивать значительное понижение эффективного активационного барьера.

Гипотеза эта привлекательна, но пока не имеет доказательств. Остается неясным также, с какой скоростью упругая энергия глобулы диссипирует в окружающую среду.

Приведем все же простую оценку ускорения реакции, основанную на предположении о трансформации энергии сорбции в энергию ФСК. Предположим, что структурное соответствие фермент — субстрат в ФСК приводит и белок, и малую молекулу в напряженное состояние (*«дыба»*). Пусть длина нерастянутой молекулы субстрата равна l_0, длина полости фермента, в которую вошел субстрат, l. Изменения длины молекул субстрата и фермента равны соответственно x и y. Тогда $x + y = l - l_0$ и условие равенства упругих сил имеет вид

$$k_S x = k_E y, \tag{6.39}$$

где k_S и k_E — коэффициенты упругости субстрата и фермента. Находим

$$x = \frac{l - l_0}{1 + k_S/k_E}, \quad y = \frac{k_S}{k_E}\frac{l - l_0}{1 + k_S/k_E}. \tag{6.40}$$

Упругая энергия субстрата, определяющая понижение энергии

активации, равна

$$\Delta E = {}^1/_2 k_S x^2 = {}^1/_2 k_S \left(\frac{l - l_0}{1 + k_S/k_E} \right)^2. \qquad (6.41)$$

Порядок k_E отвечает произведению линейного размера глобулы на модуль упругости $L\varepsilon$. Для белка $L \approx 5$ нм, $\varepsilon \sim 10^3$ Дж · см$^{-3}$. Следовательно, $k_E \approx 5 \cdot 10^{-2}$ Н/см. Наибольшая энергия упругой деформации сосредоточивается в наиболее слабом месте молекулы субстрата. Деформация валентных углов происходит значительно легче, чем валентных связей. Вместе с тем энергия, запасенная на угловых степенях свободы молекулы, может перейти на валентную связь и уменьшить энергию активации ее разрыва. Коэффициент упругости k_S, отвечающий низкочастотным деформационным колебаниям ($\nu \sim 10^{13}$ с$^{-1}$), равен примерно 0,15 Н/см. Допустим, что $\Delta E = 31{,}5$ кДж/моль (при уменьшении энергии активации на такую величину скорость реакции увеличивается в 10^5 раз). Тогда $x \approx 0{,}08$ нм, $y \approx 0{,}23$ нм, упругая энергия фермента ${}^1/_2 k_E y^2 \approx 88$ кДж/моль. Значит, суммарная энергия, расходуемая при сорбции на упругую деформацию, составляет 171 кДж/моль. Эта величина не чрезмерна, если учесть, что сорбция происходит за счет многоточечного связывания, т. е. образования многих химических и слабых связей между ферментом и субстратом. Наблюдаемая энергия сорбции представляет собой разность истинной энергии сорбции и энергии упругой деформации фермента и субстрата.

Рассмотренная модель «дыбы» — статическая. Если предположить, что упругая система динамическая и возникает резонанс колебаний молекул субстрата и фермента, то для такого же ускорения реакции потребуется средняя упругая энергия, в четыре раза меньшая, чем в статическом случае, так как биения периодически удваивают амплитуду колебаний.

В этой наглядной модели рассматриваются колебания атомных ядер, возникающие в результате образования ФСК, т. е. взаимодействия фермента с субстратом. При этом взаимодействии изменяются состояния электронных оболочек субстрата и атомных групп активного центра. Электронные оболочки испытывают возмущение вследствие взаимодействий в ФСК. Превращение субстратов в продукт есть химический процесс, т. е. изменение состояния электронных оболочек молекул. Как и в любой иной химической реакции, при этом происходят перемещения атомных ядер. Среди движений атомных ядер наименьшей энергии требуют низкочастотные деформационные колебания и повороты вокруг единичных связей, т. е. изменения конформаций. В § 6.4 уже рассматривались конформационные изменения в ФСК. Важнейшее значение для ферментативного катализа имеют взаимодействия электронных и конформационных степеней свободы — *электронно-конформационные взаимодействия* (ЭКВ). ЭКВ рассмотрены в работах Волькенштейна, а также Блюменфельда, Чернавского и их сотрудников.

§ 6.6. Электронно-конформационные взаимодействия

Для понимания природы ЭКВ полезна наглядная модель взаимодействия электронов и атомных ядер — электроны в потенциальном ящике с бесконечно высокими подвижными стенками. Совокупность атомных ядер молекулы или ее функционального участка моделируется таким ящиком (рис. 6.10). Электроны помещаются в ящике, $2n$ электронов занимают n уровней. Возможные значения энергии электронов внутри ящика легко вычисляются, исходя из представления о стоячих волнах де Бройля с узлами на стенках. Если ширина ящика L, то стоячие волны имеют длины волн

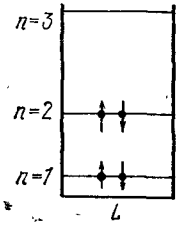


Рис. 6.10. Электроны в потенциальном ящике

$$\lambda = 2L/n, \quad n = 1, \ 2, \ 3, \ \ldots \qquad (6.42)$$

Скорость электрона в ящике находится по соотношению де Бройля (m_e — масса электрона)

$$v = \frac{h}{m_e\lambda} = \frac{nh}{2m_eL}. \qquad (6.43)$$

Внутри ящика энергия электрона равна его кинетической энергии

$$E = \frac{m_ev^2}{2} = \frac{n^2h^2}{8m_eL^2}. \qquad (6.44)$$

Электрон оказывает на стенку давление, сила которого равна

$$f = \left|\frac{dE}{dL}\right| = \frac{n^2h^2}{4m_eL^3}. \qquad (6.45)$$

В равновесии эти силы компенсированы внешними по отношению к ящику взаимодействиями. Изменение равновесия возникает либо вследствие возбуждения электронов в системе, либо вследствие добавления электронов. И то, и другое повышает давление. Не находящиеся более в равновесии стенки ящика перемещаются и переходят в новое равновесное положение на увеличенном расстоянии друг от друга $L + \Delta L$. Иными словами, работа перемещения ядер $f\Delta L$ производится за счет уменьшения энергии электронов — согласно (6.44) электронная энергия убывает при увеличении L.

Если рассматривать не прямоугольную потенциальную яму, а параболическую, т. е. воспользоваться моделью электрона-гармонического осциллятора, то легко показать, как ЭКВ снижают активационный барьер (рис. 6.11). Расширение параболы под действием добавочной силы давления означает уменьшение коэффициента упругости для осциллятора. Точка пересечения со второй параболой, отвечающей конечному состоянию ФСК, перемещается и ее ордината, представляющая собой энергию активации, понижается. Можно показать, что для значительного

уменьшения энергии активации, т. е. для большого ускорения реакции, достаточно малого к. п. д. системы.

Все это рассмотрение имеет лишь иллюстративное значение. Оно показывает, однако, что энергия электронного возбуждения

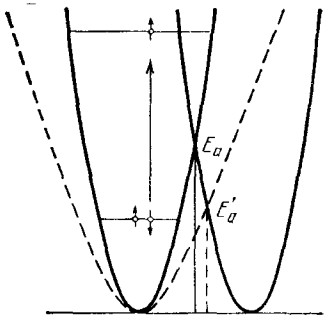


Рис. 6.11. Понижение активационного барьера в результате ЭКВ

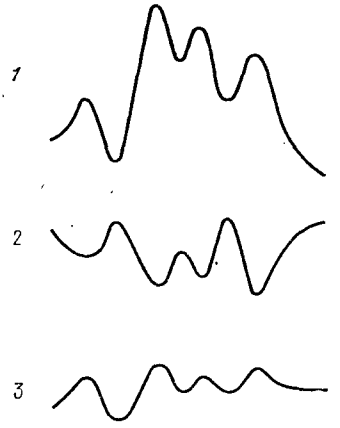


Рис. 6.12. Эффект дополнительности: *1* — профиль химической свободной энергии, *2* — профиль конформационной свободной энергии, *3* — суммарный профиль

трансформируется в работу перемещения атомных ядер, т. е. в конформационную энергию. Это влечет за собой ускорение реакции.

Ламри и Билтонен предположили, что профиль конформационной свободной энергии вдоль реакционной координаты дополнителен к профилю химической (электронной) свободной энергии (рис. 6.12). В результате в суммарном профиле активационные барьеры снижены.

Теоретические подходы к ЭКВ развиты Догонадзе с сотрудниками и Шайтаном. Движения атомных ядер в белках характеризуются амплитудами и временами, представленными в табл. 6.2.

Таблица 6.2. **Характерные амплитуды и времена тепловых флуктуаций элементов структуры белка при $T = 300$ К**

Процесс	Амплитуда, нм	Время, с
Валентные колебания	0,001—0,01	10^{-12}
Микроконформационные движения боковых групп	0,03—0,1	10^{-8}—10^{-9}
Изгибные движения α-спиралей и β-лент	0,2—0,7	10^{-7}—10^{-5}

Концепция ЭКВ исходит из того, что изменение зарядового или электронного состояния системы приводит к изменению конформации, что в свою очередь индуцирует изменение электронного состояния. Амплитуды конформационных движений относительно велики. Для их описания не пригодна модель гармонических колебаний, применяемая в теории электронно-колебательных взаимодействий. Соответственно надо иметь дело с уравнением Ланжевена для осциллятора в системе с трением:

$$m\ddot{x} + b\dot{x} + m\omega_0^2 x = F(t), \qquad (6.46)$$

где m — эффективная масса сегмента, b — коэффициент трения, ω_0 — круговая частота осциллятора, $F(t)$ — случайная сила, действующая на осциллятор со стороны окружающих частиц; $F(t)$ обусловлена тепловыми флуктуациями среды. Частоты этих конформационных движений значительно меньше упомянутых на с. 164.

По-видимому, есть основания считать, что конформационное движение представляет собой ограниченную непрерывную диффузию в протяженной потенциальной яме малой глубины. Такое движение описывается уравнением Фоккера — Планка

$$\frac{\partial P(x, t)}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} D(x) \left[\frac{\partial P(x, t)}{\partial x} + \frac{1}{\kappa T} P(x, t) \frac{\partial U(x)}{\partial x} \right]. \qquad (6.47)$$

Здесь $P(x, t)$ — плотность вероятности найти систему в момент времени t в конформации со значением координаты x, $D(x)$ — коэффициент конформационной диффузии, $D(x) = \kappa T/b(x)$, $b(x)$ — коэффициент трения, $U(x)$ — конформационный потенциал. Температурная зависимость движения определяется зависимостью $D(x)$ от энергии активации $\varepsilon(x)$

$$D(x) = D_0 e^{-\varepsilon(x)/\kappa T}. \qquad (6.48)$$

Сравнительно крупные конформационные движения в белковой глобуле возможны вследствие наличия или возникновения в ней свободных, «пустых» участков — «дырок». «Дырки» возникают в свободном объеме глобулы или проникают в глобулу из растворителя.

Таким образом, с точки зрения динамики белковая глобула есть сложная структурированная система, обладающая целым набором конформационных движений с различными временами. Задача физики состоит в построении теории диффузии в сильно структурированной среде. Такая теория необходима для понимания как проникновения субстрата к активному центру фермента, так и прохождения ионов через каналы биологических мембран (см. гл. 10, 11).

Перемещение любого лиганда, начиная с электрона, в макромолекуле вызывает изменение электронной плотности и, вслед за ним, конформационного состояния системы. Конформационную перестройку можно трактовать как возбуждение сильно затухающих длинноволновых фононов. Система «электронная плот-

ность лиганда плюс конформационная деформация» подобна полярону в физике твердого тела. Такая система названа *конформоном* (Волькенштейн). Конформон отличается от полярона сильной нелинейностью. Конформон не может перемещаться без диссипации энергии на большие расстояния. Быстрая диссипация определяется неоднородностью, апериодичностью глобулы. Для реализации ферментативного процесса достаточно конформационной перестройки в пределах нескольких связей.

Движение к активному центру есть движение конформона. Оно происходит путем конформационного раскрытия некоторой щели в глобуле, характеризуемой определенной микровязкостью. Структурное соответствие фермент — субстрат имеет динамический характер; количественной мерой соответствия может служить критическая энергия деформации щели, соответствующей размеру и форме молекулы субстрата. При значении модуля Юнга $\varepsilon \sim 10^{10}$ эрг/см^3 и длине краев щели 1 нм средняя амплитуда тепловых флуктуаций ширины щели составит ~0,07 нм. Согласно этим оценкам скорость проникновения субстрата и образование ФСК составит 10^5—10^8 с$^{-1}$. Это не обязательно лимитирующая стадия ферментативного катализа.

Движение конформона описывается уравнением (6.47) (Шайтан и Рубин).

Дальнейшее рассмотрение ЭКВ и неразрывно связанной с ЭКВ концепции релаксационных конформационных переходов (Блюменфельд) проведено в § 13.4 в связи с переносом электрона в процессах окислительного фосфорилирования.

Конечно, подлинная теория ЭКВ и ферментативного катализа в целом требует последовательного применения методов квантовой механики и квантовой химии. Ввиду большой сложности систем последовательные расчеты здесь пока невозможны. Реализуются, однако, приближенные оценки, основанные на качественных идеях квантовой химии (см. § 6.9).

Наряду с изучением ферментативного катализа экспериментальную информацию об ЭКВ могут дать исследование изменений химических (электронных) свойств биополимера, вызванных изменением лиганда или кофактора, и наблюдение возникающих при этом изменений конформационных свойств макромолекулы как целого. Такое исследование было проведено на системах аспартатаминотрансфераза (ААТ) — лиганд (кофактор). Изучалась денатурация в растворе мочевины апофермента, нормального холофермента и ряда комплексов апофермента с различными химическими модификациями кофермента. Изотермы денатурации оказались сильно зависящими от природы кофермента. Это означает, что электронные изменения в активном центре сильно влияют на конформационные свойства белка как целого. Количественный анализ полученных результатов и сопоставление ферментативного процесса, катализируемого ААТ, с реакцией в конгруэнтной модельной системе показали, что в ферментативной системе происходит выравнивание энергети-

ческих уровней различных промежуточных форм и понижение активационных барьеров. В этом и проявляется комплементарность профилей химической (электронной) и конформационной свободных энергий (с. 196). Комплементарность определяется ЭКВ.

К проблеме ЭКВ эффективно применяются качественные методы квантовой химии, позволяющие наглядно представить электронную оболочку субстрата, находящегося под возмущающим действием групп активного центра. В физике ферментов сейчас особенно существенны обоснованные качественные модели, позволяющие понять смысл наблюдаемых явлений и оценить порядки величин характерных параметров.

§ 6.7. Кооперативные свойства ферментов

Стационарная кинетика ферментативных реакций зачастую отличается от кинетики Михаэлиса — Ментен (с. 178). На кривой зависимости скорости реакции v от концентрации субстрата S или (и) концентрации модификатора наблюдаются перегибы, максимумы, плато. На рис. 6.13 для примера показана кривая

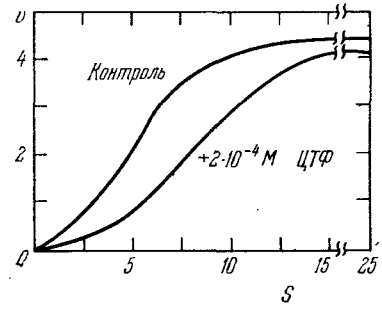


Рис. 6.13. Кривые $v(S)$ для аспартат-*транскарбамилазы*. По оси абсцисс — концентрация аспартата в 10^{-3} моль/л

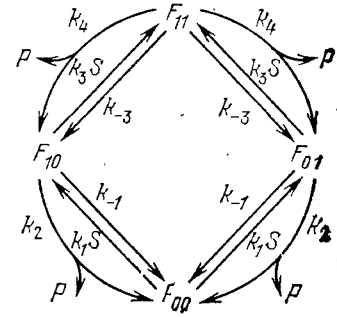


Рис. 6.14. Схема реакции с ферментом, состоящим из двух тождественных субъединиц

$v(S)$ для *аспартат-транскарбамилазы* (S — аспартат) в отсутствие и в присутствии модификатора — ЦТФ. В первом случае кривая имеет S-образную, а не гиперболическую форму.

Как правило, эти особенности объясняются наличием у фермента четвертичной структуры и взаимодействием субъединиц. Тем самым, поведение фермента кооперативно — сродство к субстрату и каталитическая активность данной субъединицы (протомера) зависят от того, в каких состояниях находятся остальные субъединицы — связали они субстрат или нет.

Рассмотрим простую модель молекулы фермента, состоящей из двух взаимодействующих тождественных субъединиц. Каждая субъединица имеет активный центр. Схема стационарного

процесса показана на рис. 6.14. Молекула фермента может существовать в трех состояниях: F_{00} (оба центра свободны), $F_{01} = F_{10}$ (один центр занят субстратом, другой свободен) и F_{11} (оба центра заняты субстратом). Уравнения стационарной кинетики имеют вид (ср. рис. 6.14)

$$\begin{aligned} \dot{F}_{00} &= -2k_1SF_{00} + 2(k_{-1} + k_2)F_{10} &&= 0, \\ 2\dot{F}_{10} &= 2k_1SF_{00} - 2(k_{-1} + k_2 + k_3S)F_{10} + 2(k_{-3} + k_4)F_{11} &&= 0, \\ \dot{F}_{11} &= 2k_3SF_{10} - 2(k_{-3} + k_4)F_{11} &&= 0, \end{aligned} \tag{6.49}$$

причем

$$F_{00} + 2F_{10} + F_{11} = E = \text{const}. \tag{6.50}$$

Скорость образования продукта, согласно рис. 6.14, равна

$$v = 2k_2F_{10} + 2k_4F_{11}. \tag{6.51}$$

При помощи уравнений (6.49) и (6.50) находим

$$v = 2k_2ES\,\frac{\alpha S + \beta K}{S^2 + 2\beta KS + \beta K^2}, \tag{6.52}$$

где $\alpha = k_4/k_2$, $\beta = K'/K$, $K = (k_{-1} + k_2)/k_1$, $K' = (k_{-3} + k_4)/k_3$.

Кооперативность, т. е. взаимодействие двух активных центров, выражается отличием α и (или) β от единицы. Действительно, при условии $\alpha = \beta = 1$

$$v = 2k_2ES\,\frac{K + S}{(K + S)^2} = \frac{v_{\max}S}{K + S}, \tag{6.53}$$

т. е. кинетика совпадает с кинетикой Михаэлиса — Ментен. Напротив, если это условие не выполнено, то на кривой $v(S)$ возможно появление точки перегиба, максимума или и того, и другого. Анализ формулы (6.52) показывает, что точки перегиба возможны при следующих условиях:

при $\alpha < 0{,}5$ и любых β,
при $1 > \alpha > 0{,}5$ и $\alpha/(2\alpha - 1) > \beta > \alpha^2/(2\alpha - 1)$,
при $\alpha > 1$ и $\alpha^2/(2\alpha - 1) > \beta > \alpha/(2\alpha - 1)$.

Максимум возможен лишь при $\alpha < 0{,}5$ и любых β.

Приведенная модель выражает *прямую кооперативность* — константы скоростей для состояний системы, в которых субстратом заняты один или два центра, различны.

Равновесная функция $\overline{Y}$ насыщения фермента субстратом для рассмотренной двухцентровой модели выражается так:

$$\overline{Y} = \frac{2F_{10} + 2F_{11}}{2(F_{00} + 2F_{10} + F_{11})} = \frac{S^2 + \beta KS}{S^2 + 2\beta KS + \beta K^2}. \tag{6.54}$$

Выражение $\overline{Y}(S)$ обращается в формулу изотермы адсорбции Ленгмюра при $\beta = 1$. При $\beta \neq 1$ кривая $\overline{Y}(S)$ может иметь перегиб, но не максимум.

Таким образом, наличие особенностей на кривых $v(S)$, $\bar{Y}(S)$ в стационарных (соответственно, равновесных) условиях указывает на кооперативность. Отсутствие таких особенностей еще не означает, что кооперативности нет.

Другая модель — *модель косвенной кооперативности* — была предложена Моно, Уайменом и Шанжё (*модель МУШ*). Молекула белка моделируется олигомером, состоящим из двух или

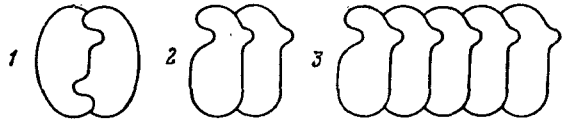


Рис. 6.15. Возможные структуры изологичного (*1*) и гетерологичного (*2*) димеров и гетерологичного полимера (*3*)

большего числа идентичных субъединиц — протомеров, занимающих эквивалентные пространственные положения. Тем самым, молекула обладает определенной симметрией. Она может быть построена изологично или гетерологично; в последнем случае возможна и большая длина олигомера (рис. 6.15). Каждому лиганду (субстрату или модификатору) отвечает один активный центр протомера.

Предполагается, что олигомер как целое может находиться в двух или нескольких конформационных состояниях. Сродство к лиганду меняется при изменении состояния олигомера. Такая система кооперативна. Без ограничения общности рассмотрим димер, который может находиться в двух состояниях, обозначаемых R и T. В каждом из этих состояний димер способен присоединить 0, 1 или 2 молекулы лиганда S. Следовательно, число различных состояний димера равно шести: R_{00}, $R_{10}=R_{01}$, R_{11}, T_{00}, $T_{10}=T_{01}$, T_{11}. Условия равновесия имеют вид

$$T_{00}=LR_{00},$$
$$R_{10}=2R_{00}S/K_R, \quad R_{11}={}^1/_2R_{10}S/K_R=R_{00}S^2/K_R^2, \qquad (6.55)$$
$$T_{10}=2T_{00}S/K_T, \quad T_{11}={}^1/_2T_{10}S/K_T=T_{00}S^2/K_T^2.$$

Здесь K_R и K_T — константы диссоциации для S в состояниях R и T, L — константа равновесия для перехода $R \rightleftarrows T$ в отсутствие S. Общая концентрация фермента постоянна:

$$R_{00}+R_{10}+R_{11}+T_{00}+T_{10}+T_{11}=E. \qquad (6.56)$$

Функция насыщения фермента субстратом имеет вид

$$\bar{Y}=\frac{R_{10}+2R_{11}+T_{10}+2T_{11}}{2(R_{00}+R_{10}+R_{11}+T_{00}+T_{10}+T_{11})}=$$
$$=\frac{K_R(1+Lg)(1+Lg^2)^{-1}S+S^2}{K_R^2(1+Lg)(1+Lg^2)^{-1}+2K_R(1+Lg)(1+Lg^2)^{-1}S+S^2}, \qquad (6.57)$$

где $g = K_R/K_T$. Кривая $\bar{Y}(S)$ имеет перегиб. При $g = 1$ или при L, стремящемся к нулю или бесконечности, кооперативность исчезает и последнее соотношение вновь обращается в выражение для изотермы Ленгмюра

$$\bar{Y} = \frac{S}{K_R + S}. \tag{6.58}$$

Соответствующее выражение для скорости реакции превращения субстрата, полученное из условий равновесия, имеет вид

$$v = 2Ek\frac{1 + \varkappa Lg^2}{1 + Lg^2}\,\frac{K_R(1 + \varkappa Lg)(1 + \varkappa Lg^2)^{-1}S + S^2}{K_R^2(1 + Lg)(1 + Lg^2)^{-1} + 2K_R(1 + Lg)(1 + Lg^2)^{-1}S + S^2}, \tag{6.59}$$

где k — константа скорости для состояний R_{10} и R_{11}, а $\varkappa k$ — для состояний T_{10} и T_{11}.

Кооперативность в модели МУШ косвенная, так как присоединение лиганда вызывает сдвиг равновесия конформаций. При обобщении уравнения (6.57) на систему с n протомерами получаем

$$\bar{Y} = \frac{Lgx(1 + gx)^{n-1} + x(1 + x)^{n-1}}{L(1 + gx)^n + (1 + x)^n}, \tag{6.60}$$

где $x = S/K_R$.

При $g \ll 1$ и не слишком больших L и $\varkappa$ формулы (6.57) и (6.59) для димера принимают вид

$$\bar{Y} \approx x\frac{1 + x}{L + (1 + x)^2}, \tag{6.61}$$

$$v \approx 2kx\frac{1 + x}{L + (1 + x)^2}. \tag{6.62}$$

Допустим, что наряду с субстратом S на димер действуют ингибитор I и активатор A и каждый из двух протомеров содержит по три активных центра — по одному для S, I и A. Считая для простоты, что димер присоединяет I только в T-состоянии и A — только в R-состоянии, получаем при $g \ll 1$ функцию насыщения фермента субстратом

$$\bar{Y} \approx x\frac{1 + x}{L' + (1 + x)^2}, \tag{6.63}$$

где $L' = L(1 + I/K_I)^2(1 + A/K_A)^{-2}$. Ингибитор повышает косвенную кооперативность, активатор ее уменьшает.

Если кооперативность положительна, т. е. присоединение лиганда активирует фермент, модели прямой и косвенной кооперативности могут приводить к эквивалентным результатам. Однако, в отличие от модели МУШ, модель прямой кооперативности может описывать и отрицательную кооперативность, т. е. уменьшение сродства к лиганду по мере насыщения активных центров (Кошланд).

Умбаргер в 1956 г. обнаружил существование последовательных ферментативных реакций, в которых конечный метаболит влияет на активность фермента, катализирующего первую реакцию последовательности. Сейчас известно множество таких систем, называемых *аллостерическими* («инопространственными» по-гречески). В частности, установлены случаи ингибирования,

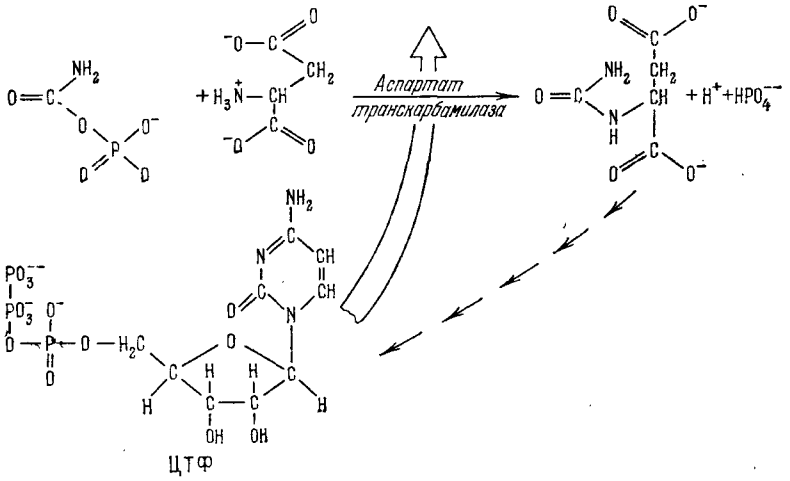


Рис. 6.16. Схема аллостерической обратной связи

кинетика которого сходна с кинетикой конкурентного ингибирования, хотя структура аллостерического ингибитора отлична от структуры субстрата. Так, аспартат-транскарбамилаза (АТК) является ферментом, катализирующим первое звено в цепи превращений, ведущих к синтезу ЦТФ. Этот конечный продукт цепи ингибирует АТК (рис. 6.16). Очевидна целесообразность такой системы.

Если конечный метаболит немедленно потребляется в последующих реакциях, то вся система работает. Однако, если возникает избыток конечного метаболита, то он прекращает работу всей системы.

Аллостеризм — важное явление, обеспечивающее регуляцию действия ферментов на молекулярном уровне. Наличие регуляции биохимических процессов означает существование каналов прямой и обратной связи, по которым передается надлежащая информация. Передача информации в клетке есть передача химических сигналов, т. е. молекул и ионов. В клетке функционируют вещества, реактивность которых определяется воздействием на них молекулярных сигналов. Поскольку источником таких сигналов служат ферменты, именно они подлежат влиянию химических обратных связей. Можно прийти к логическому выводу о существовании регуляторных ферментных систем. Уже говорилось, что фермент можно рассматривать как преобразова-

тель сигналов: входной сигнал, т. е. субстрат, преобразуется в выходной сигнал, т. е. продукт. Если выходной сигнал влияет на работу преобразователя, то реализуется обратная связь, положительная или отрицательная, в зависимости от того, активирует или ингибирует конечный продукт функцию фермента.

Исследование аллостерических ферментов (АСФ) показало, что они обладают четвертичной структурой и кооперативностью. Об этом свидетельствует кривая $v(S)$ для аспартат-транскарбамилазы, показанная на рис. 6.13. ЦТФ, в присутствии которого исчезает S-образность кривой, является аллостерическим ингибитором. Другой пример АСФ — треониндезаминаза. Кинетику превращения треонина этим ферментом можно представить формулой

$$\lg \frac{v}{v_{\max} - v} = n \lg S - \lg K, \qquad (6.64)$$

а кинетику аллостерического ингибирования — формулой

$$\lg \frac{v}{v_0 - v} = \lg K' - n' \lg I. \qquad (6.65)$$

Здесь v — стационарная скорость, $v_{\max}$ — максимальная скорость, v_0 — скорость при $I = 0$, K и K' — константы. Для кинетики Михаэлиса — Ментен должно быть $n = n' = 1$. Шанжё нашел $n = 1{,}37$, $n' = 1{,}86$. Эти результаты без труда объясняются кооперативностью — взаимодействием субъединиц. В следующем разделе сходные явления будут разобраны на примере гемоглобина. Установлено, что каждая субъединица АСФ имеет активный центр для субстрата и другой активный центр — для аллостерического эффектора. Наблюдаются и более сложные случаи.

Наличие четвертичной структуры у АСФ определяет возможность их диссоциации на субъединицы под действием субстратов и аллостерических эффекторов. Происходит смещение равновесия между олигомерными формами АСФ. Это также проявляется в кинетике.

Особенности на кривых $v(S)$, $v(I)$ могут возникать и в отсутствие кооперативных взаимодействий вследствие неравновесных конформационных свойств фермента. Допустим, что молекула фермента, переработавшая субстрат в продукт, выходит из реакции в активном конформационном состоянии. Если время релаксации, т. е. время возвращения в исходное невозмущенное состояние, больше времени между встречами фермента с субстратом или того же порядка, то кинетика может имитировать кооперативную. Схема такого процесса показана на рис. 6.17. Здесь F_0 — свободная от субстрата молекула фермента в исходной конформации, F_1 — неактивный ФСК, F_2 — активный ФСК, F_3 — свободный фермент в активной конформации. Решая соответствующие уравнения стационарной кинетики, получаем скорость реакции

$$v = \frac{AS^2 + BS}{CS^2 + DS + K}, \qquad (6.66)$$

где A, B, C, D, K — комбинации кинетических констант. Выражение (6.60) сходно с (6.59), несмотря на отсутствие кооперативных взаимодействий. Особенности на кривой $v(S)$ исчезают, если $k_3 = 0$ или $k_5 = 0$. Действительно, в некоторых случаях наблюдались очень большие времена конформационных перестроек ферментов — порядка минут и даже десятков минут. Такие особенности на кривых $v(S)$, как промежуточные плато, по-видимому, объясняются неравновесностью ферментативных систем. Однако большей частью наличие перегибов и даже максимумов объясняется взаимодействием субъединиц в белке, обладающем четвертичной структурой (см. § 6.8).

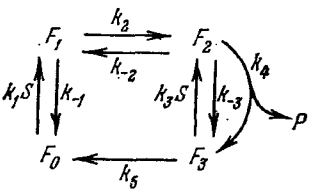


Рис. 6.17. Схема реакции по Рабину

Мы рассматривали здесь лишь сравнительно простые ферментативные процессы. В более сложных случаях расчеты даже в условиях стационарности становятся громоздкими — приходится решать совместно большое число уравнений. Для этих задач разработаны алгоритмы, в частности, основанные на *теории графов* (Гольдштейн, Волькенштейн). Графом в математике называется топологическая схема, построенная из узловых точек и линий, их соединяющих. В сущности, схемы на рис. 6.14, 6.17 являются графами. Такого рода алгоритмы позволяют получать аналитические выражения для скоростей реакций, не решая кинетических уравнений.

Следует подчеркнуть, что в сколько-нибудь сложных случаях число констант скоростей настолько велико, что они не могут быть установлены на основе экспериментов, проводимых в стационарных условиях. Нестационарная ферментативная кинетика и, тем самым, механизм действия ферментов эффективно изучаются методами *химической релаксации*, развитыми Эйгеном. Система выводится из равновесного или стационарного состояния быстрым изменением внешнего параметра и изучается кинетика ее приближения к новому равновесному или стационарному состоянию. Чаще всего пользуются скачком концентрации или температуры, воздействием ультразвука и др. Доступны измерению времена релаксации вплоть до 10^{-10} с.

Рассмотрим простейшую одностадийную реакцию (S — лиганд) $F_0 + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} F_1$. Кинетическое уравнение имеет вид

$$\dot{F}_0 = -k_1 S + k_{-1} F_1. \tag{6.67}$$

Имеем отклонения от стационарных концентраций F_0, S, F_1: $F_0 = \bar{F}_0 + x_0$, $F_1 = \bar{F}_1 + x_1$, $S = \bar{S} + y$. Уравнение (6.67) дает

$$\dot{x}_0 = -k_1 \bar{F}_0 y - k_1 \bar{S} x_0 - k_1 x_0 y + k_{-1} x_1. \tag{6.68}$$

При малом возмущении пренебрегаем $k_1 x_0 y$. Из закона сохранения массы следует, что $x_0 = -x_1 = y$. Следовательно,

$$\dot{y} = -(k_1 \bar{F}_0 + k_1 \bar{S} + k_{-1}) y \tag{6.69}$$

или

$$\dot{y} + \tau^{-1} y = 0, \qquad (6.70)$$

где $\tau^{-1} = k_1 \bar{F}_0 + k_1 \bar{S} + k_{-1}$. Решение (6.67) имеет вид

$$y = y(0) e^{-t/\tau}. \qquad (6.71)$$

Значение y в момент $t = 0$ обозначено $y(0)$. Измерение τ при разных концентрациях $\bar{F}_0$ и $\bar{S}$ позволяет определить k_1 и k_{-1}.

Мы воспользовались здесь обычным приемом линеаризации нелинейного уравнения (см. § 15.2).

§ 6.8. Миоглобин и гемоглобин

Гемоглобин (Hb) и миоглобин (Mb) — не ферменты. Их функция состоит в обратимом связывании молекулярного кислорода O_2. Миоглобин служит депо кислорода, запасая его для последующего потребления. Поэтому большие количества Mb содержатся в организмах китообразных, проводящих длительное время под водой. Гемоглобин — функциональный белок эритроцитов, служащий для переноса кислорода от легких ко всем органам и тканям и участвующий в обратном транспорте углекислоты.

Исследование Mb и Hb дает, однако, информацию, весьма ценную для понимания свойств обычных и аллостерических ферментов, для понимания электронно-конформационных взаимодействий. Связывание O_2 и других лигандов этими белками вполне сходно со связыванием субстрата ферментом. Молекулярный кислород проникает в полость молекул Mb и Hb, но, в отличие от субстрата, не подвергается химическому превращению. Иногда Mb и Hb называют «почетными ферментами».

Миоглобин и гемоглобин получаются в кристаллической форме. Оба белка детально изучены методом рентгеноструктурного анализа с разрешением до 0,28 нм, как в оксигенированной (MbO_2, HbO_8), так и в дезоксигенированной форме (Mb, Hb). Наличие в Mb и Hb простетических групп *гема*, обладающего специфическими электронными свойствами, позволяет эффективно пользоваться при изучении Mb и Hb методами спектроскопии, ЭПР, а также магнитной восприимчивостью, эффектом Мёссбауэра (см. с. 139) и т. д.

Mb не имеет четвертичной структуры (с. 113), молекула Hb состоит из четырех субъединиц — двух единиц α и двух β, каждая из которых подобна, но не тождественна молекуле Mb. Соответственно Hb обладает, в отличие от Mb, кооперативными свойствами — в Hb реализуется так называемое *гем-гем-взаимодействие*.

Кислород и другие лиганды присоединяются к группе гема, насыщая шестую координационную валентность атома железа. Образование этой связи вызывает ряд событий в молекуле белка.

Гем представляет собой ферропротопорфирин (см. рис. 2.14). Атом Fe, находящийся в двухвалентном ферросостоянии (Fe^{2+}), координационно связан с четырьмя атомами азота пиррольных

групп плоского порфиринового кольца. Пятая координационная связь, направленная перпендикулярно к плоскости кольца, соединяет атом Fe с имидазолом гистидила, шестая валентность либо свободна, либо занята лигандом.

Гемоглобин и миоглобин и их оксигенированные формы содержат феррогем. При окислении Hb и Mb образуются феррисоединения, содержащие трехвалентный атом железа Fe^{3+}.

Таблица 6.3. **Магнитные свойства гемоглобина**

Соединение	Валентность	Шестой лиганд	Магнитный момент, магнетоны Бора	Спин
Гемоглобин (Hb)	2	Нет	5,2—5,5	2
Оксигемоглобив (HbO_8)	2	O_2	0	0
Карбоксигемоглобин ($Hb(CO)_4$)	2	CO	0	0
Ферригемоглобин (метгемоглобин)	3	H_2O	5,6—5,8	$^5/_2$
Гидроксиметгемоглобин	3	OH^-	4,5—4,7	$^1/_2$, $^5/_2$
Азид ферригемоглобина	3	N_3^-	2,4—2,8	1,2
Цианид ферригемоглобина	3	CN^-	2,3—2,5	$^1/_2$

Атом Fe парамагнитен. В табл. 6.3 приведены характеристики магнитных свойств Hb и его производных в различных состояниях.

Мы видим, что феррогем может быть и высокоспиновом (Hb) и низкоспиновом (HbO_8, $Hb(CO)_4$) состояниях. Связывание ли-

Таблица 6.4. **Спектры поглощения некоторых гем-соединений**

Соединение	α-полоса		β-полоса		Полоса Соре	
	λ, нм	$\varepsilon \cdot 10^{-3}$	λ, нм	$\varepsilon \cdot 10^{-3}$	λ, нм	$\varepsilon \cdot 10^{-3}$
Гем	565	6,1			390	39,6
CO-гем	562	14,6	530	11,9	406,5	147
Hb	555	13,5			430	119
HbO_8	577	14,6	542	13,8	412	135
$Hb(CO)_4$	569	13,4	539	13,4	419	191
Mb	555	12,0			435	114
MbO_2	582	13,1	544	12,7	417	119
MbCO	578	12,3	541	14,1	423	185

Длинноволновые полосы гема, Hb и Mb, обычно не называются α-полосами.

ганда проявляется в спектре поглощения в видимой области (рис. 6.18). В табл. 6.4 приведены соответствующие данные.

Интерпретация магнитных и спектральных свойств гема основывается на квантовомеханическом анализе. Внешние электроны атома железа имеют конфигурацию $3d^6$ для Fe^{2+} и $3d^5$ для Fe^{3+}. Теоретические расчеты основаны на теории поля лигандов. Молекулярные орбитали системы представляются линейными комбинациями орбиталей Fe, порфиринового цикла и лигандов.

Расчеты дают распределение электронной плотности и уровни электронной энергии. Ряд вопросов остается, однако, не исследованным, в частности, необходимо рассмотрение напряженного гема с пятью координационными связями в Hb и Mb.

Гемоглобин и миоглобин парамагнитны, в отличие от подавляющего большинства других биологических молекул. В связи с этим следует упомянуть о так называемой *магнитобиологии*,

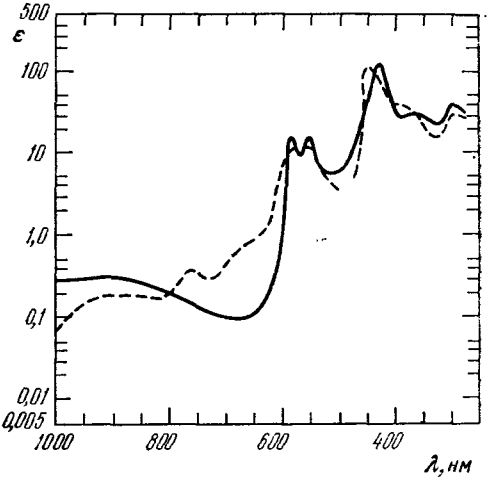


Рис. 6.18. Спектры поглощения Hb (штриховая кривая) и HbO_8 (сплошная кривая)

изучающей влияние магнитных полей на биологические явления. В принципе магнитные поля могли бы влиять на поведение Hb и Mb и соответствующих клеток, а также на кинетику биохимических реакций, идущих с участием свободных радикалов. Однако достоверных данных о воздействии постоянного магнитного поля на биологические явления пока почти нет.

Особое место занимают открытые в торфяных болотах США бактерии, содержащие ферромагнитный магнетит $FeO \cdot Fe_2O_3$. Эти бактерии способны ориентироваться в магнитном поле, их можно намагнитить. В то же время нет никаких научных оснований для утверждений о биологической роли «омагниченной воды» — о том, что вода, прошедшая через магнитное поле, якобы ускоряет рост растений, имеет бактерицидные свойства и т. д.

Известны первичные структуры Hb и Mb многих видов животных, а также большого числа мутантных гемоглобинов человека (см. с. 36). Расшифровка пространственного строения Hb и Mb, выявление конформационных изменений, возникающих при связывании лигандов, имеют принципиальное значение. Именно для Mb и Hb проблема связи строения со свойствами изучена особенно подробно.

Кривая насыщения Mb молекулярным кислородом $\overline{Y}(p)$, где p — парциальное давление O_2, подобна изотерме Ленгмюра

$$\overline{Y} = \frac{p}{K + p}. \qquad (6.72)$$

Напротив, кривая $\overline{Y}(p)$ для Hb имеет перегиб — S-образную форму. Ее можно описать *уравнением Хилла*

$$\overline{Y} = \frac{p^n}{K' + p^n}, \qquad (6.73)$$

где K' — константа, а параметр $n = 2{,}8$. Обе кривые показаны на рис. 6.19 $\left(1 - \overline{Y} = \frac{Kp}{1 + Kp};\ 2 - \overline{Y} = \frac{Kp^n}{1 + Kp^n},\ n = 2{,}8\right)$.

Физиологический смысл S-образной кривой $Y(p)$ для Hb состоит в уменьшении сродства Hb к O_2 по мере отщепления O_2. Изменения парциального давления O_2 в тканях невелики. Если бы для Hb была характерна гиперболическая кривая $Y(p)$ (6.72), то лишь малая доля переносимого O_2 отщеплялась бы в тканях. В результате организм задыхался бы даже в атмосфере чистого кислорода. Эффективность дыхательного транспорта регулируется кроме того присутствием кофактора — 2,3-дифосфоглицерата (ДФГ), понижающего сродство Hb к O_2, и эффектом Бора.

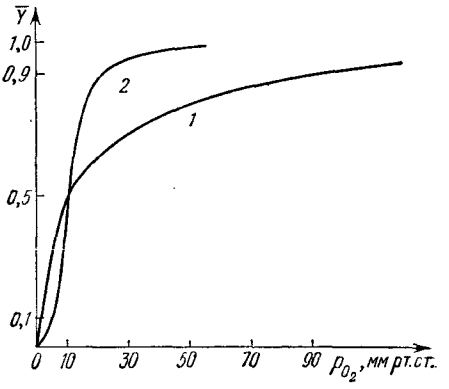


Рис. 6.19. Кривые насыщения молекулярным кислородом миоглобина (*1*) и гемоглобина (*2*)

Эффект Бора, свойственный Hb, но не Mb, состоит в зависимости сродства Hb к O_2 от pH среды. Сродство минимально вблизи pH 6 и максимально вблизи pH 9. Иными словами, малые концентрации протонов облегчают присоединение O_2 и, наоборот, малые концентрации O_2 облегчают присоединение протонов к Hb. Повышая pH венозной крови и тем самым увеличивая ее способность поглощать бикарбонат, эффект Бора обеспечивает главный механизм обратного транспорта CO_2 от тканей к легким.

Отличие коэффициента n от 1 в уравнении Хилла (6.70) и соответствующая S-образность кривой $Y(p)$ отражают гем-гем-взаимодействие, т. е. взаимосвязь четырех субъединиц и, следовательно, кооперативность присоединения O_2. Изменения энтальпии при связывании первой, второй, третьей и четвертой молекул O_2 гемоглобином овцы равны соответственно $\Delta H_1 = -65{,}9 \pm 3{,}3$, $\Delta H_2 = -47{,}8 \pm 10{,}5$, $\Delta H_3 = -32{,}7 \pm 13{,}8$ и $\Delta H_4 =$

$= -36{,}5 \pm 13{,}8$ кДж/моль. Связывание кислорода заметно усиливается по мере присоединения.

События, происходящие в молекуле Hb при оксигенации, были раскрыты Перутцом в результате рентгенографического исследования. Молекула O_2 присоединяется к атому Fe гема. В HbO_8 атом Fe расположен в плоскости гема, в его центре. В высокоспиновом Hb атом Fe отстоит от этой плоскости примерно на 0,05 нм в направлении имидазольного кольца Гис *F*8. В таком состоянии координационное число Fe равно 5. Оксигенация переводит Fe в низкоспиновое состояние и увеличивает число лигандов Fe на единицу. Эти изменения вызывают изменение контактов между гемом и плотно упакованными аминокислотными остатками белка. Иными словами, в результате ЭКВ происходит перестройка белковых глобул.

С гемом непосредственно контактируют 60 атомов белка. При введении даже наименьшего лиганда OH^-, имеющего радиус 0,15 нм, происходит конформационная перестройка в β-субъединицах Hb. В этих субъединицах группа $\gamma\text{-}CH_3$ остатка Вал *E*11 оказывается на расстоянии 0,25 нм от OH^-, что меньше суммы ван-дер-ваальсовых радиусов. Следовательно, в β-глобулах Hb нет места даже для наименьшего лиганда и при оксигенации расстояние между гемом и Вал *E*11 должно увеличиваться примерно на 0,1 нм. Напротив, в α-субъединицах такого перемещения нет, так как ширина «кармана» достаточна для внедрения лиганда.

В HbO_8 С-концы всех четырех цепей имеют полную свободу поворотов, а предпоследние остатки Тир (140) — частичную. Напротив, в Hb каждый из С-концов дважды закреплен солевыми

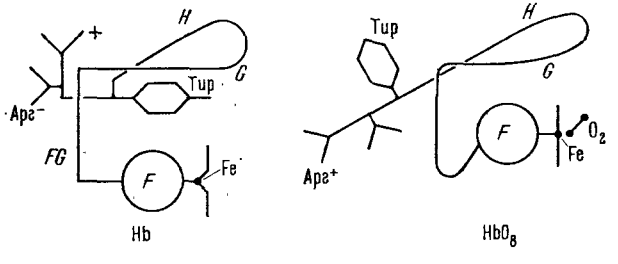


Рис. 6.20. Схема перемещения Тир HG2 (140) при оксигенации (Перутц)

мостиками Арг (141) α_1 с Асп (126) α_2, Гис (146) β_1 с Лиз (40) α_2 и Асп (84) β_1. Все четыре предпоследних Тир жестко закреплены в полостях между спиралями *F* и *H* ван-дер-ваальсовыми и водородными связями. Оксигенация Hb вызывает перемещение спирали *F* и разрыв солевых мостиков, вследствие чего Тир (140) выводится из «кармана» между спиралями *F* и *H*; одновременно ширина «кармана» уменьшается на 0,13 нм в α- и на 0,2 нм в β-цепях. Эта перестройка схематически показана на рис. 6.20. Перестройка в субглобулах и разрывы со-

левых мостиков изменяют четвертичную структуру. В контактах $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_2$ происходят сдвиги на 0,1 нм, в $\alpha_1\beta_2$ и $\alpha_2\beta_1$ на 0,7 нм — очень большую величину. Эти последние контакты имеют наибольшее значение. Мутантные замещения в соответствующих областях заметно уменьшают гем-гем-взаимодействие.

Конечно, сам термин «гем-гем-взаимодействие» условен. Речь идет не о взаимодействии групп гема друг с другом — расстояние между ними слишком велико для этого. Взаимодействие субъединиц определяется конформационными событиями, триггером которых служит перемещение атома Fe в плоскость порфиринового кольца и соответствующая передвижка проксимального Гис на 0,075—0,095 нм. Спираль *F* перемещается к центру молекулы и выталкивает Тир (140) из полости между спиралями *F* и *H*. Вытолкнутый Тир тянет за собой Арг (141) и разрывает поэтому солевые мостики с противолежащей α-цепью. Ситуация в β-цепях иная. Прежде чем лиганд доберется до атома Fe, он должен «открыть» полость вблизи гема. Образуется связь Fe — лиганд, атом Fe перемещается в плоскость гема, спираль *F* сдвигается к центру молекулы и выталкивает Тир (145) из его «кармана». Этот остаток тянет Гис (146) и разрывает его солевой мостик с Асп (94).

Структура Hb стабилизована ДФГ, образующим дополнительные солевые мостики между β-субглобулами. При оксигенации ДФГ удаляется из молекулы.

По мысли Перутца каждая из субъединиц может быть в состоянии *дезокси-* и *окси*-конформации. Присоединение O_2 переводит субъединицу в *окси*-конформацию, но четвертичная структура остается как целое *дезокси*, пока не присоединены две молекулы O_2. Оксигенация предположительно начинается с α-субглобул, так как в них имеется достаточно места для внедрения лиганда. Схема процесса, изображенная на рис. 6.21, такова:

$$(\alpha_1^D\alpha_2^D\beta_1^D\beta_2^D)^D \xrightarrow{+O_2} (\alpha_1^O\alpha_2^D\beta_1^D\beta_2^D)^D \xrightarrow{+O_2} (\alpha_1^O\alpha_2^O\beta_1^D\beta_2^D)^D \xrightarrow{-\text{ДФГ}}$$

$$\xrightarrow{-\text{ДФГ}} (\alpha_1^O\alpha_2^O\beta_1^D\beta_2^D)^O \xrightarrow{+O_2} (\alpha_1^O\alpha_2^O\beta_1^O\beta_2^D)^O \xrightarrow{+O_2} (\alpha_1^O\alpha_2^O\beta_1^O\beta_2^O)^O.$$

Сущность процесса сводится к тому, что вследствие специфической конструкции группа гема усиливает малое изменение атомного радиуса, испытываемое Fe при переходе от высокоспинового состояния к низкоспиновому, и трансформирует это изменение в большее смещение Гис, связанного с гемом. Электронные события трансформируются в конформационные, с вытекающими из них последствиями.

Энергия взаимодействия субъединиц составляет около 50 кДж/моль, что соответствует энергии шести солевых мостиков, образующих контакты.

Hb тетрамерен, его расщепление на димеры происходит при малых концентрациях. При этом должны разорваться солевые мостики и четвертичная структура примет *окси*-конформацию. Кооперативные эффекты определяются тетрамерной структурой.

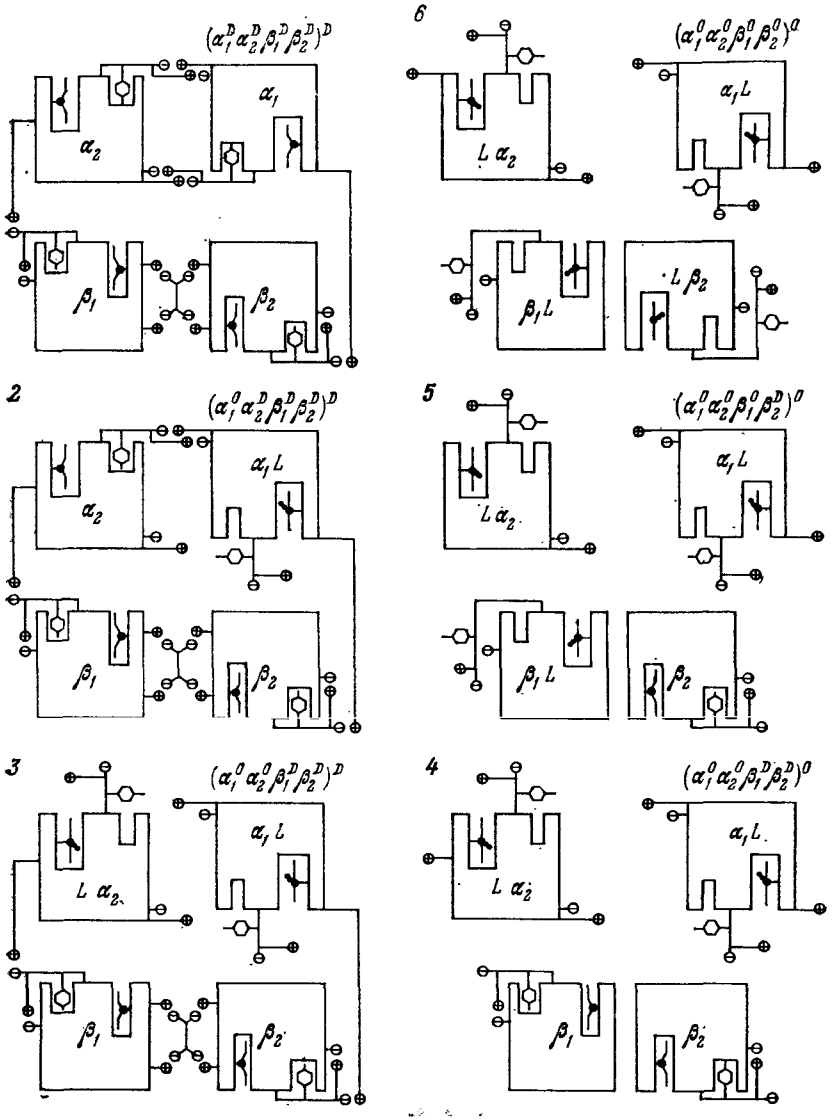


Рис. 6.21. Схема оксигенации гемоглобина по Перутцу: *1* — Hb с интактными солевыми мостиками и с молекулой ДФГ, «зажатой» между двумя β-цепями; *2* — HbO_2; *3* — HbO_4. На стадиях *1* — *2* и *2* — *3* оксигенируются α-цепи; *4* — HbO_4 с измененной конформацией; на стадиях *3*—*4* происходит конформационное превращение; *5* — HbO_6; *6* — HbO_8

Ценная информация об ЭКВ в Hb получена с помощью магнитной поляриметрии (§ 5.8) и эффекта Мёссбауэра (§ 5.3). Дисперсия магнитного вращения (ДМВ) и магнитный круговой дихроизм (МКД) чрезвычайно чувствительны к особенностям строения Hb и Mb, которые практически неразличимы по спектрам поглощения. На рис. 6.22 показаны кривые ДМВ для Mb и его комплексов с лигандами. Это — электронные эффекты. Их

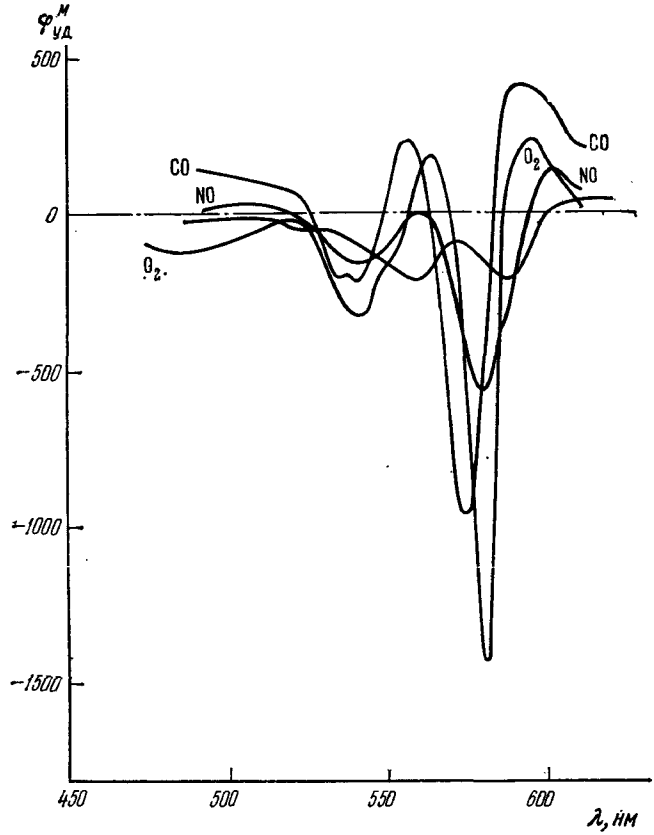


Рис. 6.22. Кривые дисперсии магнитного вращенин Mb и его комплексов

хорошая корреляция с конформационной стабильностью комплексов при денатурации мочевиной непосредственно демонстрирует ЭКВ.

Почти не обнаруживаемая в поглощении, но наблюдаемая в ДМВ и МКД α-полоса Mb весьма чувствительна к гем-гем-взаимодействию. У Mb, а также α- и β-субъединиц Hb в α- и β-полосах ДМВ примерно одинакова. Напротив, в тетрамерном Hb эффект в α-полосе вдвое больше, чем в β-полосе (рис. 6.23). Метод ДМВ позволил исследовать диссоциацию Hb на субъедп-

ницы. Установлено, что при pH 10—11 тетрамеры диссоциируют на некооперативные димеры $\alpha\beta$.

Эффект Бора (с. 209) получил молекулярное истолкование. При конформационных переходах *окси*-Hb $\rightleftarrows$ *дезокси*-Hb изменяется окружение трех пар слабых оснований таким образом, что они стремятся присоединить протоны при отщеплении O_2. Это объясняется конкретными передвижками ионогенных аминокислотных остатков. Соотноше-

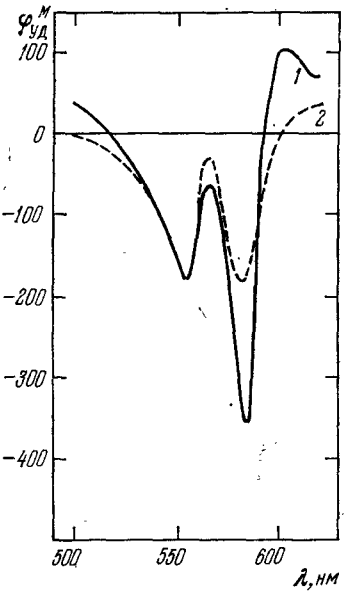


Рис. 6.23. Кривые ДМВ Hb (*1*) и изолированных α- и β-цепей (*2*)

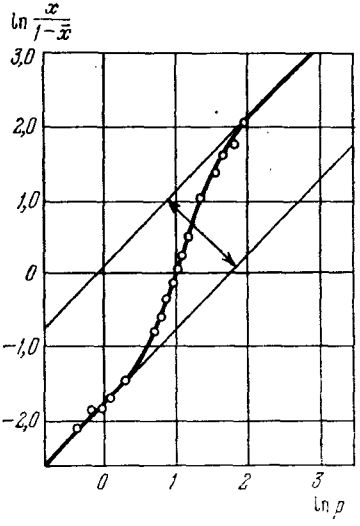


Рис. 6.24. График Хилла для насыщения гемоглобина лошади кислородом

ние между O_2 и протонами в Hb такое же, как субстрата и аллостерического эффектора в АСФ.

Уаймен построил феноменологическую теорию связанных функций для Hb и АСФ. Допустим, что молекула АСФ связывает два лиганда X и Y, имея q активных центров для X и r — для Y. Полная концентрация молекул АСФ равна

$$c = c_0 \sum_{i=0}^{q} \sum_{j=0}^{r} K_{ij} x^i y^j, \tag{6.74}$$

где c_0 — концентрация свободных молекул, x и y — концентрации X и Y, K_{ij} — константа равновесия для реакции

$$M + iX + jY \rightleftarrows MX_iY_j.$$

Функции насыщения равны

$$Y_X = \frac{\partial \ln \sum \sum K_{ij} x^i y^j}{\partial \ln x}, \quad Y_Y = \frac{\partial \ln \sum \sum K_{ij} x^i y^j}{\partial \ln y}. \tag{6.75}$$

Отсюда следует

$$\left(\frac{\partial \ln Y_X}{\partial \ln y}\right)_x = \left(\frac{\partial \ln Y_Y}{\partial \ln x}\right)_y. \tag{6.76}$$

Удобно представить кривую равновесия лиганда не величиной Y_X, но в виде зависимости $\ln[\bar{x}/(1-\bar{x})]$, где $\bar{x} = Y_X/q$, от $\ln x$ и ввести параметр n, определяемый так:

$$n = \frac{d\ln[\bar{x}/(1-\bar{x})]}{d\ln x} = \frac{1}{\bar{x}(1-\bar{x})}\frac{dx}{d\ln x}. \qquad (6.77)$$

Если все центры идентичны и независимы друг от друга, то график имеет вид прямой с $n = 1$. При стабилизирующих взаимодействиях, т. е. при $(\partial Y_X/\partial \ln x) > q$, значение $n > 1$. Это соответствует уравнению Хилла (6.73), которое можно переписать в виде

$$\ln\frac{\bar{x}}{1-\bar{x}} = \ln K + n\ln x. \qquad (6.78)$$

На рис. 6.24 приведен график (6.78), где $x = p$, для Hb лошади. Здесь $n = 2{,}95 \pm 0{,}05$, свободная энергия взаимодействия Hb с O_2 равна 10,9 кДж/моль. С помощью теории Уаймена легко описать эффект Бора ($X = O_2$, $Y = H^+$).

Гемоглобин может связывать O_2 и CO. При насыщении коэффициент распределения A не зависит от парциального давления обоих газов (*первый закон Холдейна*):

$$\frac{[Hb(CO)_4]}{[HbO_8]} = A\frac{p_{CO}}{p_{O_2}}. \qquad (6.79)$$

Второй закон гласит, что насыщение при взаимодействии со смесью O_2 и CO есть функция $p_{O_2} + Ap_{CO}$. Этот закон следует из (6.79).

Свойства гемоглобина демонстрируют динамическое поведение белка. И третичная, и четвертичная структуры Hb быстро и непрерывно осциллируют между *окси-* и *дезокси*-конформациями. Присоединение лиганда вызывает сдвиг конформационного равновесия. Это и есть ЭКВ.

§ 6.9. Бионеорганическая химия и биофизика

Гемоглобин и миоглобин — белки, содержащие соединение переходного металла, гем, в качестве простетической группы. Изучение такого рода веществ относится к области бионеорганической химии, о которой уже упоминалось выше (с. 50). Здесь уместно рассказать о проблемах бионеорганической химии в связи с биофизикой.

Бионеорганическая химия изучает биологически функциональные соединения металлов (а также некоторых неметаллов, например селена). Металлы необходимы для нормальной жизнедеятельности организмов. В табл. 6.5 приведены показательные цифры. В организме содержатся и другие металлы, но в гораздо меньших количествах.

Скелеты позвоночных, раковины моллюсков и т. д. построены в основном из солей кальция. Ионы Ca^{2+} играют важнейшую роль в механохимических процессах (мышечное сокращение,

Таблица 6.5. Содержание металлов (в г) в теле человека весом 70 кг

Ca	1050	Na	105	Fe	4,25	Cu	0,15	Mo	0,015
K	245	Mg	35	Zn	1,9	Mn	0,020	Co	0,003

гл. 12) и в других биологических явлениях. Ионы щелочных металлов K^+, Na^+ определяют механизмы нервной проводимости (гл. 10 и 11). Ионы Mg^{2+} существенны как для мышечного сокращения, так и для двуспиральной структуры нуклеиновых кислот (гл. 7). Ионы железа Fe^{2+} и Fe^{3+} определяют свойства миоглобина и гемоглобина, а также других гемсодержащих белков, в частности цитохромов, участвующих в окислительно-восстановительных процессах в дыхательной цепи и в фотосинтезе (гл. 13 и 14). Ионы Zn^{2+} фигурируют в активных центрах ряда важнейших ферментов, в частности в ДНК- и РНК-полимеразах (гл. 7). Ионы Cu^{2+} содержатся в ряде важных белков, то же относится и к Mn^{2+}, Mo^{2+} (нитрогеназа, см. далее). Ион Co^{2+} фигурирует в витамине B_{12} (кобаламин).

Почти всегда мы имеем дело не с металлоорганическими соединениями, содержащими связи металл — углерод, но с ионными координационными соединениями. Жизнь зарождалась, по-видимому, в водной среде (см. гл. 17), металлоорганические соединения не растворяются, а разлагаются водой, в то время как ионы металлов хорошо растворимы в воде. О роли водной среды свидетельствует и важное значение молибдена в биологии. Содержание этого элемента в земной коре незначительно. Крик в полушутливой форме писал, что наличие молибдена в организмах свидетельствует о том, что жизнь занесена на Землю инопланетянами. Однако в морской воде содержание Mo того же порядка, что Fe и Zn.

Ионы металлов, содержащие незаполненную *d*-оболочку (а также *f*-оболочку), являются переходными — способными иметь различную валентность и образовывать комплексные, координационные соединения. Изучение таких соединений является главной областью современной неорганической химии. Соответственно важный раздел бионеорганической химии занимается ферментами, содержащими атомы переходных металлов в качестве кофакторов или в составе простетических групп (гемсодержащие белки).

Современные представления о координационных соединениях переходных металлов основываются на так называемой *теории поля лигандов*. Это — квантовомеханическая теория соответствующих молекул, в которой рассматриваются как молекулярные орбитали центрального иона металла, так и его лигандов в координационной сфере. Связи металл — лиганд не характеристичны и лиганды сильно влияют друг на друга в химических реакциях. Координация лигандов определяет симметрию молекулы и расщепление энергетических уровней *d*-электронов. В отсут-

ствие лигандов все пять уровней d-электронов совпадают. Напомним, что обозначение d отвечает орбитальному квантовому числу $l = 2$. Следовательно, возможны пять уровней: магнитное квантовое число может иметь значения от $-l$ до l, т. е. -2, -1, 0, 1, 2. Согласно принципу Паули, на каждом уровне могут

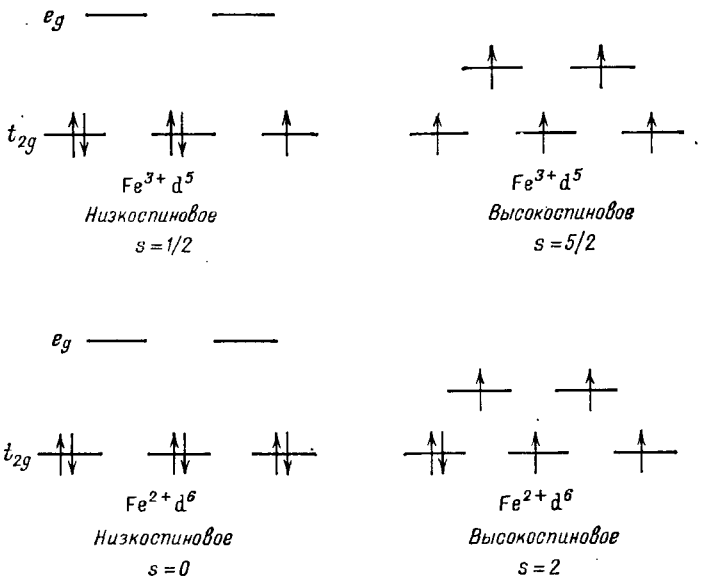


Рис. 6.25. Электронные структуры ионов Fe^{2+} и Fe^{3+}

находиться два электрона с антипараллельными спинами; всего на d-подоболочке может быть десять электронов. В поле лигандов d-уровни расщепляются в тем большей мере, чем ниже симметрия системы. Так, для плоского квадрата с ионом металла посередине имеются четыре d-уровня, для октаэдра и тетраэдра — два уровня, для икосаэдра расщепления нет вовсе. Взаимодействие электронных состояний с колебаниями комплекса приводит к дальнейшему понижению симметрии и расщеплению уровней. Это так называемый *эффект Яна — Теллера*, ярко проявляющийся в спектрах поглощения комплексов.

Металлы в комплексах фигурируют в двух типах соединений, в высокоспиновом и низкоспиновом состояниях. Соответствующие уровни для ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} показаны на рис. 6.25. *Правило Гунда* говорит, что наименьшей энергии в многоэлектронном атоме отвечает параллельное расположение спинов, т. е. высокоспиновое состояние. Однако если поле лигандов сильнее и расщепление уровней значительно, то электроны поневоле вынуждены располагаться на самых низких уровнях и реализуется низкоспиновое состояние. Такова ситуация в MbO_2 и HbO_8, где железо находится в ферроформе (ср. табл. 6.2).

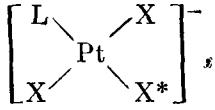
Комплексные соединения переходных металлов обладают особыми свойствами, удобными для их экспериментального исследования. Этими свойствами являются наличие полос поглощения в длинноволновой — видимой — области спектра, парамагнетизм и наличие спектров ЭПР (за немногими исключениями, такими как MbO_2 и HbO_8). Как уже сказано, симметричные комплексы характеризуются выразительными спектрами магнитного вращения и магнитного кругового дихроизма.

Среди ферментов, содержащих ионы переходных металлов, важное место принадлежит нитрогеназе. Ряд видов бактерий (в частности, находящихся в симбиозе с бобовыми растениями) и водорослей обладает способностью восстанавливать азот воздуха до аммиака. В конечном счете именно этим способом в организмы доставляется азот, необходимый как для белков, так и для нуклеиновых кислот. Такая реакция, как $N_2 + 3H_2 \rightarrow 2NH_3$, в газе требует гетерогенного катализатора, давления порядка 250 атм и температуры до 450°С (процесс Габера — Боша). В бактериях эта реакция идет с участием нитрогеназы — комплекса двух белков, один из которых содержит молибден и железо, а другой — только железо. Роль Мо является определяющей. Несмотря на то, что структура нитрогеназы пока еще мало изучена, с помощью качественных методов квантовой химии, основанных на теории поля лигандов, удалось выявить роль молибдена. Активация молекулярного азота N_2 происходит, по-видимому, в комплексе $Me - N \equiv N - Me$ (Me — металл). При этом связь NN в N_2 из тройной превращается практически в единичную. Рентгеноструктурный анализ показал, что в модельных комплексах N_2 с металлами длина связи NN равна 0,137 нм (длина связи N≡N 0,110 нм, N=N 0,123 нм, N—N 0,144 нм).

Изучение металлоферментов важно для дальнейшего проникновения в физику ферментативного катализа. Область белка, взаимодействующая с ионом металла в активном центре, представляет собой полидентатный лиганд, образуя несколько координационных связей с металлом. Это справедливо для кофакторов — ионов металлов, но не для простетической группы гема в Hb и Mb, в которой такая связь одна. Благодаря «мягкости» *d*-электронной оболочки, ее большей деформируемости, чем *s*- и *p*-оболочки, она приобретает напряженное, «*энтатическое*» состояние в активном центре (Уильямс и Валли). Это проявляется в отличии электронных свойств переходных металлов в ферментах от этих свойств в модельных низкомолекулярных соединениях. Разнятся спектры ЭПР, спектры поглощения и т. д.

В химии комплексных соединений известны два явления, существенные для понимания свойств металлоферментов. Первое явление — *дисторсионная изомерия*. В ряде случаев в комплексе происходят изменения длин связей при сохранении общей структуры. Так, октаэдр $Cu(NH_3)_2Br_4$ известен в двух формах — более и менее сплющенной. Второе явление — *транс-влияние*, открытое Черняевым у квадратных комплексов платины.

Рассмотрим комплекс



L, X — лиганды. При замещении одного из лигандов X на L, лиганд X*, находящийся в *транс*-положении по отношению к заместителю L, обретает повышенную подвижность. В реакциях

$$[PtLX_3]^- + Y^- \rightarrow [PtLX_2Y]^- + X^-$$

по способности стимулировать *транс*-замещение лиганды L образуют ряд

$$CN^- \sim C_2H_4 \sim CO \gg NO_2^- > J^- > Br^- > Cl^- > NH_3 > OH^- > H_2O.$$

Напряжение *d*-оболочки металла приводит к изменению конформации полидентатного лиганда — совокупности аминокислотных остатков в активном центре, координационно связанных с металлом и с ним соседствующих. Если к металлу присоединен низкомолекулярный лиганд, т. е. субстрат, то на его состоянии непосредственно сказываются эти конформационные события. Возникает ситуация, схематически изображенная на рис. 6.26: посредством *транс*-влияния субстрат воздействует на связи металл — белок, что влечет за собой изменение связей субстрат — белок вследствие ЭКВ и изменение состояния субстрата. Эти особенности делают металлоферменты особенно удобными объектами для изучения ЭКВ. При этом, как уже сказано, ион переходного металла является своего рода меткой, позволяющей исследовать ЭКВ в видимой области спектра методом ЭПР и т. д. Мы уже видели, что конформационные свойства белка сказываются на электронных свойствах гема, что находит свое выражение в магнитной спектрополяриметрии гемсодержащих белков. Вопросы эти еще мало изучены.

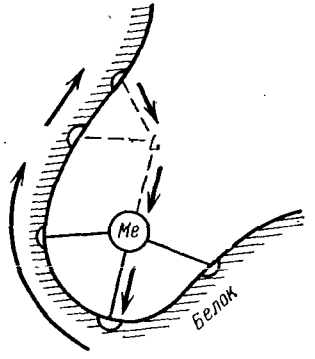


Рис. 6.26. Схема электронно-конформационных взаимодействий в металлоферменте: *Me* — металл, *L* — лиганд (субстрат)

Бионеорганическая химия важна для медицины, фармакологии и сельского хозяйства. Избыток или недостаток металлов влечет за собой патологические последствия и для человека, и для сельскохозяйственных культур. По-видимому, значительна роль металлов — прежде всего Zn — в канцерогенезе. Металлы фигурируют в ряде медикаментов.

Металлы важны для белковой инженерии — для искусственного получения белков с заранее заданными свойствами. Пока что это дело будущего.

Глава 7

ФИЗИКА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

§ 7.1. Молекулярная биология и физика

Молекулярная биология исследует молекулярную природу основных явлений жизни, прежде всего наследственности и изменчивости. Эти явления определяются строением и свойствами нуклеиновых кислот — информационных макромолекул. Становление молекулярной биологии связано с открытием генетической роли нуклеиновых кислот и с ее расшифровкой. *Гены*, т. е. фрагменты молекул ДНК и РНК, программируют синтез белков. Эти молекулы являются «законодательными», а белки — «исполнительными». Молекулярная биология началась с открытия *трансформации бактерий* посредством ДНК (Эвери, Мак-Леод, Мак-Карти, 1944). Молекулярная биология ищет объяснение биологических явлений в химии и молекулярной физике. Она изучает широкую совокупность жизненных процессов, в том числе ферментативный катализ, мембранный транспорт, механохимические явления и т. д. В отличие от классической биохимии, молекулярная биология объединяется с физикой и ее специфика состоит именно в физических аспектах исследований и задач.

В предыдущих главах рассмотрены проблемы молекулярной биофизики, связанные со строением и функциональностью белков. Теперь мы обратимся к физическим вопросам, относящимся к строению и свойствам нуклеиновых кислот, к биосинтезу белка. Перечислим эти вопросы.

1. Первичная, вторичная и третичная структуры всех видов нуклеиновых кислот.

2. *Генетический код*, определяющий связь между последовательностью нуклеотидов в генетической ДНК и РНК и в информационных РНК и последовательностью аминокислотных остатков в белковой цепи. Проблема генетического кода, возникающая при атомно-молекулярном рассмотрении процессов биосинтеза белка, является физический. Эта проблема решена.

3. Физический смысл и происхождение *генетического кода*. Код не является случайным, по-видимому, он возник в ходе добиологической эволюции. Физика призвана раскрыть внутренние закономерности кода и построить теоретическую модель его эволюции.

4. Конформационные свойства нуклеиновых кислот. Поведение нуклеиновых кислот, так же как и белков, определяется

электронно-конформационными взаимодействиями (ЭКВ). Теоретические и экспериментальные исследования конформаций нуклеиновых кислот и их изменений раскрывают механизмы молекулярных биологических процессов. Сюда относятся, в частности, денатурация и ренатурация нуклеиновых кислот, редупликация ДНК и репликация (*транскрипция* и *обратная транскрипция*) ДНК и РНК.

5. Межнуклеиновое и нуклеиново-белковое молекулярное узнавание. Нуклеиново-белковое взаимодействие имеет важнейшее значение для регуляции биосинтеза белка, для регуляции действия генов.

6. Взаимодействия нуклеиновых кислот с малыми молекулами и ионами, имеющие важное значение для функции нуклеиновых кислот и формирования высших уровней их структуры.

7. Строение и свойства надмолекулярных нуклеиново-белковых систем — *рибосом* и *хромосом*. Молекулярные механизмы их функционирования.

8. Физические механизмы точечных мутаций, т. е. нарушений первичной структуры информационных макромолекул ДНК и РНК.

9. Теоретическое (физико-математическое) моделирование процессов развития — добиологической и биологической эволюции, *онтогенеза* и *канцерогенеза*,— опирающееся на известные свойства нуклеиновых кислот.

Этот перечень не претендует на полноту. Некоторые из задач, здесь указанных, уже решены, разработка других находится в начальной стадии.

Практическое применение молекулярной биологии и молекулярной генетики успешно развивается в *генной инженерии* и *биотехнологии*. Эти области техники посвящены прежде всего получению необходимых для медицины и сельского хозяйства белков и полипептидов, основанному на искусственном манипулировании генами.

Физика сыграла важную роль в построении молекулярной биологии. Достаточно указать на открытие двойной спирали ДНК, сделанное с помощью рентгеноструктурного анализа, на четкую формулировку задачи генетического кода. Общефизический подход к биологическим проблемам, реализованный в книге Шредингера «Что такое жизнь с точки зрения физики» (1945), стимулировал развитие молекулярной биологии.

В последние 10—15 лет ситуация в молекулярной биологии изменилась. После изучения биологических молекул как таковых, после расшифровки генетического кода, молекулярная биология обратилась к гораздо более сложным надмолекулярным и клеточным системам. Оказалось возможным подойти к проблемам, связанным с молекулярной генетикой *эукариот*, с явлениями онтогенеза. На этом этапе молекулярная биология отошла от теоретической и экспериментальной молекулярной физики. Причины этого лежат в сложности процессов, изучаемых

современной молекулярной биологией. Лишь в редких случаях информация об этих процессах достаточна для формулировки физических задач. Однако физико-математическое исследование поведения эукариот (*митоз, мейоз*) и онтогенеза развивается и служит важным источником идей для теоретической биологии. Мы познакомимся с этими направлениями исследований в последних главах книги.

§ 7.2. Структура нуклеиновых кислот

Далеко не всегда связь между структурой молекулы и ее функциональными свойствами проста и очевидна. Мы видели, как сложно установление такой связи для белков. Иначе обстоит дело с нуклеиновыми кислотами, в частности, с ДНК. Здесь по крайней мере одна важнейшая функция — редупликация ДНК — была качественно объяснена сразу же после открытия вторичной структуры.

Вторичная структура ДНК была установлена методом рентгенографии в работах Франклин, Крика, Уотсона и Уилкинза (1952). Ориентированные волокна литиевой соли нативной ДНК дали рентгенограммы, содержащие до 100 рефлексов (см. рис. 5.5). Крестообразное расположение рефлексов сразу показывает, что структура является спиральной.

Нативная ДНК построена в виде *двойной спирали*, состоящей из двух взаимно перевитых полинуклеотидных цепей, азотистые основания которых попарно соединены водородными связями. Аденин (А) одной цепи связан с тимином (Т) другой, а гуанин (Г) — с цитозином (Ц). Схемы этих пар (*уотсон-криковские пары*) показаны на рис. 7.1, молекулярная модель двойной спирали (*B*-форма, см. далее) — на рис. 7.2. Таким образом, две цепи ДНК в двойной спирали взаимно комплементарны, т. е. имеется однозначное соответствие между их нуклеотидами: Т соответствует А и Г соответствует Ц. Это соответствие раскрывает смысл правил Чаргаффа (с. 39).

Таблица 7.1. **Геометрия ДНК в различных формах**

Соль ДНК	Влажность, %	Число звеньев на виток спирали	Шаг спирали, нм	Перемещение на один нуклеотид, нм	Поворот на нуклеотид, град	φ_1, град	φ_2, град
Na, *A*-форма	75	11	2,82	0,255	32,7	20	16
Na, *B*-форма	92	10	3,46	0,346	36	—	—
Li, *B*-форма	66	10	3,37	0,337	36	2	5
Li, *C*-форма	66	9,3	3,10	0,332	39	6	10

Здесь φ_1 — угол между перпендикуляром к оси спирали и плоскостью оснований, φ_2 — двугранный угол между плоскостями оснований пары.

ДНК может кристаллизоваться в различных двуспиральных формах. При низкой относительной влажности (до 70%) ДНК кристаллизуется в моноклинной A-форме с параметрами решетки $a = 4{,}04$ нм, $b = 2{,}207$ нм, $\beta = 97{,}1°$. При большей влажности реализуется гексагональная B-форма, для которой $a = 4{,}6$ нм.

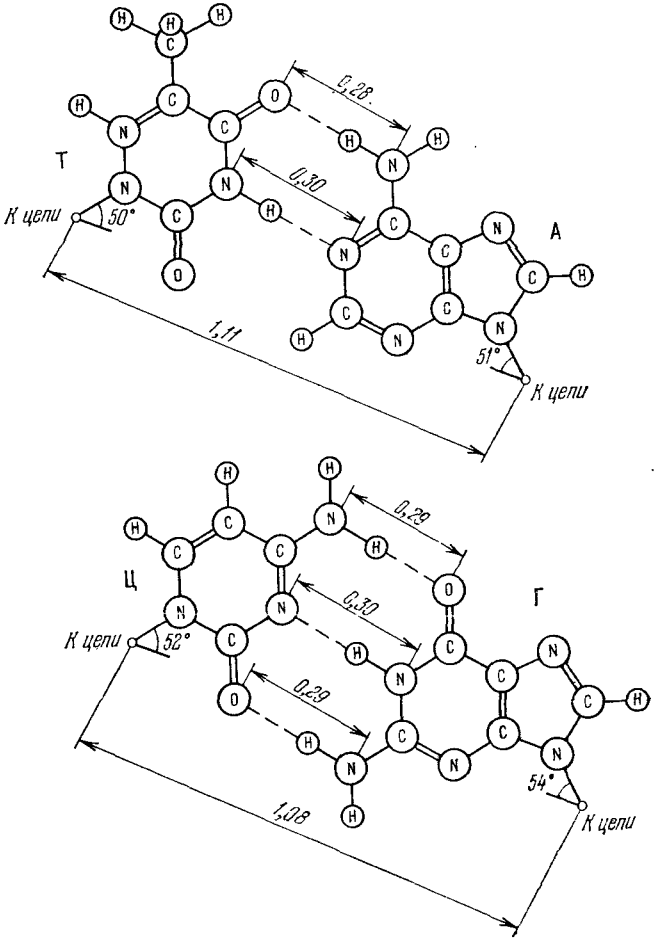


Рис. 7.1. Пары АТ и ГЦ

Сбе формы Na-соли ДНК показаны схематически на рис. 7.3. Позднее была открыта C-форма. В табл. 7.1 приведены характеристики A-, B-, C-форм ДНК. Они различаются значениями шага двойной спирали, углами поворота между соседними парами оснований и наклоном плоскости пар к оси спирали.

Конформация полинуклеотидной цепи определяется набором углов поворота, показанных на рис. 7.4. Углы отсчитываются

следующим образом: если смотреть вдоль связи, вокруг которой происходит вращение, то дальняя связь вращается по часовой

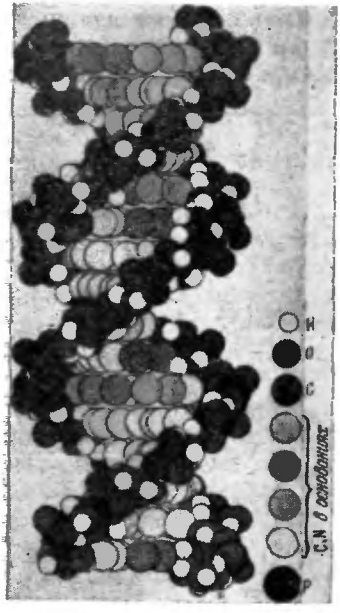


Рис. 7.2. *Молекулярная модель B-формы ДНК*

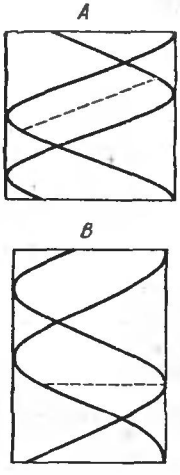


Рис. 7.3. *Схема строения A- и B-форм Na-соли ДНК*

стрелке относительно ближней. Отсчет производится от *цис*-положения связей (рис. 7.5). В табл. 7.2 приведены значения углов поворота для трех конформаций ДНК.

Конформация полинуклеотидной цепи зависит от конформации сахара — рибозы или дезоксирибозы. Сахар встречается в четырех конформациях, различающихся тем, какой из атомов

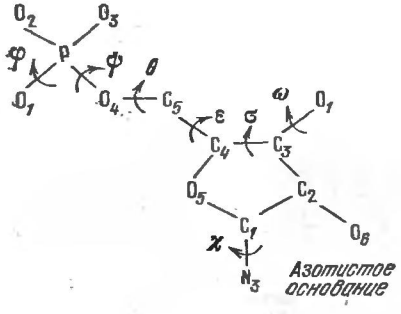


Рис. 7.4. Углы поворота в звене полинуклеотидной цепи

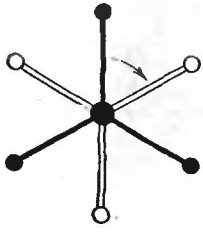


Рис. 7.5. Направление поворота

пятичленного цикла, C_2 или C_3 (рис. 7.4), выведен из плоскости остальных четырех атомов. Если атом C_2 (или C_3) находится по ту же сторону от плоскости, что и C_5, то конформация именуется *эндо*, в противоположном случае — *экзо*. Возможны, следовательно, C_2-*эндо*-, C_3-*эндо*-, C_2-*экзо*- и C_3-*экзо*-формы. Первые две встречаются чаще.

Таблица 7.2. Конформации ДНК

Форма	φ, град	θ, град	ε, град	σ, град	ω, град	Φ, град
A	283	167	67	76	221	279
B	281	212	58	130	147	282
C	315	143	48	168	211	212

Теоретические расчеты конформаций полинуклеотидных цепей и двойных спиралей не просты, так как эти конформации зависят от многих углов. Конформационно лабильна и группа рибозы или дезоксирибозы. Соответственно проводятся расчеты с «жестким» и «мягким» сахаром.

Эксперимент (диффузное рассеяние рентгеновских лучей, КД и т. д.) и теория показали, что следует говорить не об отдельных конформациях *A*, *B*, *C* ДНК, но о конформационных семействах *A* и *B*. *C*-форма, а также *T*- и *D*-формы сходны с *B*-формой и относятся к *B*-семейству. Двойная спираль оказывается структурой, способной к непрерывному изменению конформации. В пределах семейств *A* и *B* конформации меняются некооперативно, вероятно, путем плавного изменения параметров спирали. Напротив, переход от одного семейства к другому, $A \rightarrow B$, происходит резко, кооперативно и сопровождается скачкообразным изменением конформации сахара от 3-*эндо* к 2-*эндо*. Показано, что для заданного расположения азотистых оснований существует ограниченное число конформаций сахарофосфатного остова регулярной двойной спирали (Иванов и сотрудники).

Сведения о конформационной структуре нуклеиновых кислот получаются непосредственно из данных рентгеноструктурного анализа монокристаллов олигонуклеотидов. На рис. 7.6 показаны структуры двух форм ДНК — *B* и *Z*.

Двойная спираль ДНК в любой возможной ее конформации характеризуется широкой и узкой спиральными бороздками, выемками на поверхности макромолекулы.

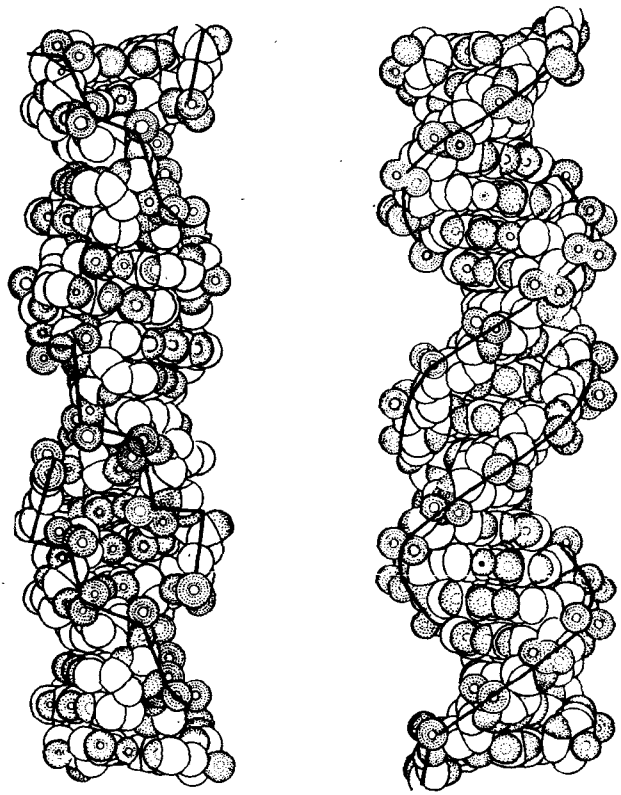
Двойные спирали ДНК в *A*-, *B*- и *C*-формах — правые. Позднее Рич и сотрудники открыли левую двойную спираль ДНК. Так как она зигзагообразна, эта форма была названа *Z-формой*. Впервые *Z*-форма была получена для двуспиральных гексамеров ГЦ:

ЦГЦГЦГ

ГЦГЦГЦ

Z-формы образуются цепями из чередующихся пуринов и пиримидинов. ДНК стабилизуется в *Z*-форме при высокой концентрации соли или в результате бромирования или метилирования.

Дальнейшая работа состояла в поиске *Z*-формы в природе. Были получены антитела кролика к коротким бромированным двойным спиралям, построенным из чередующихся Г и Ц. С помощью этих антител удалось обнаружить *Z*-ДНК в политенных



Z-форма *B-форма*

Рис. 7.6. *Z*- и *B*-формы ДНК

хромосомах личинок плодовой мушки. Антитела к *Z*-форме связываются такими хромосомами в определенных местах. Работа с синтетическими ДНК показала, что последовательности пурин — пиримидин могут испытывать переходы от правой *B*-формы к левой *Z*-форме, в зависимости от концентрации соли или химической модификации — от метилирования. Такие переходы обратимы. Метилирование и деметилирование, по-видимому, существенны для контроля активности генов. Есть основания думать, что *Z*-ДНК играет некоторую регуляторную роль.

Антигены, связывающие антитела к Z-ДНК, оказались содержащимися в организмах мышей, больных волчанкой. Есть предположение о важной роли Z-ДНК в аутоиммунных заболеваниях.

Ряд фактов свидетельствует о конформационных превращениях ДНК, существенных, по-видимому, для ее функционирования, для взаимодействия с ферментами (полимеразы), для регуляции действия генов и т. д. (см. § 8.3 и 8.8).

Конформационная динамика ДНК исследована в ряде теоретических работ (Иванов, Журкин и др.). Определены диапазоны тепловых флуктуаций угла спирального вращения, изучена

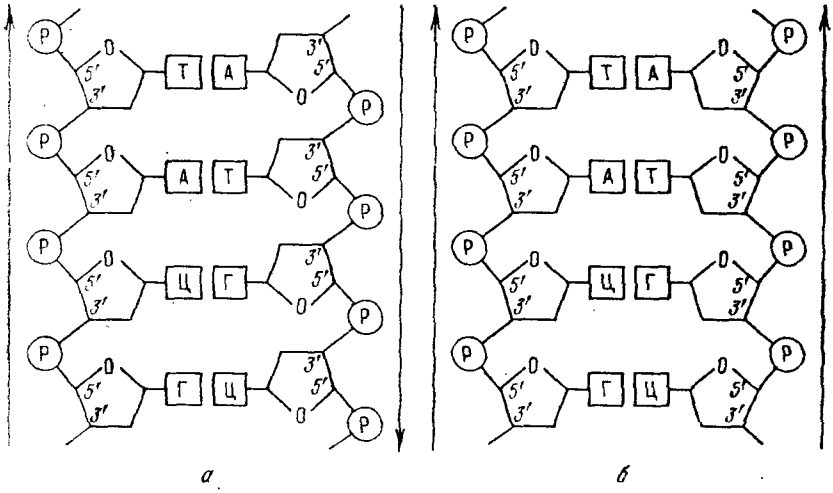


Рис. 7.7. Схемы двойных спиралей, построенных из антипараллельных (*а*) и параллельных (*б*) цепей

гибкость двойной спирали в зависимости от ее первичной и вторичной структур. На основе этих расчетов получены модели нуклеосом — участков хромосом, в которых ДНК «намотана» на гистоны и негистоновые белки (см. с. 294). Эти модели в общем согласуются с опытом.

Очевидно, что имеются две возможности организации двойной спирали — из параллельных и антипараллельных цепей (рис. 7.7). Справедливость второй модели доказана рентгенографическими и биохимическими данными. Цепи в двойной спирали антипараллельны.

Специфическая двуспиральная структура ДНК непосредственно объясняет важные факты — репликацию ДНК при митозе и метаболическую устойчивость ДНК. По мысли Крика и Уотсона, при репликации двойная спираль сначала разделяется вследствие разрыва водородных связей и раскручивания цепей. Каждая из них служит матрицей для сборки новой цепи, комплементарной к матрице. Мономеры новой цепи соединяются с матрицей, об-

разуя уотсон-криковские пары АТ, ТА, ГЦ и ЦГ. Одновременно происходит поликонденсация нуклеозидтрифосфатов и в результате образуются две двойные спирали, тождественные первоначальной. Такая *полуконсервативная модель* (новая спираль содержит одну старую и одну новую цепь) действительно подтверждается опытом (см. § 7.7). Ошибки при репликации являются *точечными мутациями* (§ 8.7). Двойная спираль подобна одномерному кристаллу, азотистые основания в ней плотно упакованы и прочно связаны слабыми взаимодействиями (§ 7.3). Этим объясняется метаболическая устойчивость ДНК, высокая сохранность генов. В свое время Шредингер задавался вопросом о причинах такой сохранности вещества, построенного из легких атомов С, Н, N, О, Р. Открытие двойной спирали ответило на этот вопрос.

ДНК — самые большие молекулы, известные науке. Из фага Т2 были выделены кольцевые двуспиральные молекулы ДНК длиной до 49 мкм, а из *E. coli* — до 400 мкм, что соответствует м.м. порядка 10^9. На рис. 7.8 и 7.9 показаны фотографии молекул ДНК, полученные в электронном микроскопе.

Растворы нативной ДНК очень вязки. Однако это не означает, что вся макромолекула является двуспиральным жестким стержнем. ДНК свернута в очень рыхлый клубок, так как жесткость её велика — *персистентная длина* ДНК (см. с. 77) в 0,15 М NaCl равна 50 нм, в 0,0014 М NaCl — 80 нм. Длина 50 нм отвечает примерно 150 нуклеотидным звеньям.

Плотность ДНК, приблизительно равная 1,7 г/см^3, линейно растет с увеличением содержания Г+Ц-пар (м. м. А + Т = 247, Г + Ц = 273). Вместе с тем АТ- и ГЦ-пары занимают примерно одинаковые объемы в двойной спирали. На каждый процент ГЦ приходится возрастание плотности на 0,00103 г/см^3.

При нагревании, изменении pH и т. д. происходит денатурация ДНК — переход двойная спираль — два клубка (§ 7.4, 7.5). За этим переходом удобно следить по спектру поглощения ДНК (в области 260 нм) и по КД. Двойная спираль обладает в этой области значительным гипохромизмом — интенсивность поглощения у спирализованной нуклеиновой кислоты значительно меньше, чем у денатурированной, клубкообразной.

Круговой дихроизм (КД) ориентированных и неориентированных пленок ДНК меняется при изменении влажности и ионной силы. Спектры КД Na- и Li-солей ДНК при относительной влажности (о. в.) $\geqslant 92\%$ те же, что у растворов и отвечают *B*-форме. При о. в. от 75 до 66% пленки с 3% Na^+ дают спектр КД, отвечающий *A*-форме. КД позволяет судить о конформационных свойствах ДНК в растворах и в пленках. Весьма интересны исследования анизотропии КД и оптической активности макромолекул ДНК, ориентированных в потоке (с.158).

Указанными методами обнаруживаются двуспиральные участки в молекулах РНК, в которых нет комплементарных цепей и для которых не соблюдается правило Чаргаффа. Двуспиральные

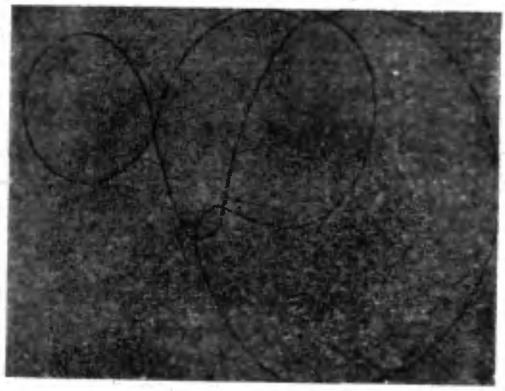


Рис. 7.8. Электронная микрофотография кольцевой двойной спирали ДНК из фага λ. Увеличение 44 000

Рис. 7.9. Электронная микрофотография ДНК из фага Т2. Увеличение 80 000

участки нуклеиновых кислот моделируются синтетическими полинуклеотидами. В 0,1 М NaCl поли-А образует двойную спираль с поли-У, причем наибольший гипохромизм, т. е. наибольшая степень двуспиральности, наблюдается при составе смеси полинуклеотидов 1 : 1. В присутствии двухвалентных катионов,

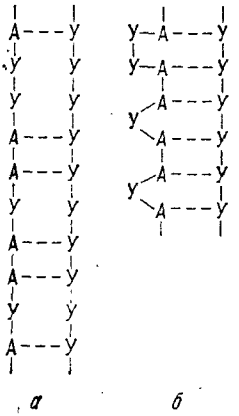


Рис. 7.10. Возможные вторичные структуры комплексов поли-У с поли-АУ

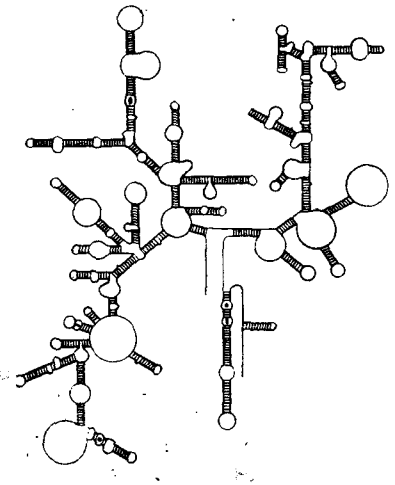


Рис. 7.11. Схема вторичной структуры одной из рибосомных РНК *E. coli*. Показаны двуспиральные участки и петли

в $1{,}2 \times 10^{-2}$ М растворе $MgCl_2$ максимальный гипохромизм отвечает соотношению поли-У: поли-А = 2 : 1, т. е. образуется тройная спираль. Катионы необходимы для спирализации, так как они компенсируют заряды фосфатных групп и, тем самым, уменьшают электростатическое отталкивание цепей.

Изучение смесей поли-У и сополимеров поли-АУ различного состава позволило установить природу дефектных участков в двойной спирали. Аденин А комплементарен У и связывается с ним, У с У не связывается. При взаимодействии поли-У с поли-АУ возможны две структуры, показанные на рис. 7.10. Либо в тех местах, где против У расположен У, нет водородных связей, но спираль остается спиралью (рис. 7.10, *а*), либо неспаренные нуклеотиды вытесняются из спирали и образуют *петли* (рис. 7.10, *б*). Эти две структуры различаются соотношением поли-У : поли-АУ одинаковой степени полимеризации в системе с максимальным гипохромизмом, т. е. в двойной спирали. Для структуры *а* это соотношение составляет 10 : 10, для структуры *б* — 6 : 10. Опыт однозначно свидетельствует в пользу второй возможности — образуются петли.

Все типы РНК характеризуются как наличием протяженных петель, так и двуспиральных участков, образующих «*шпильки*».

На рис. 7.11 показана структура одной из РНК. Спаривание оснований происходит лишь в двуспиральных участках. Денатурационная стабильность РНК также растет с содержанием ГЦ-пар.

Особенно детально изучены сравнительно малые молекулы тРНК. Они также содержат двуспиральные участки. О них рассказано в § 8.4.

Недавно было установлено, что РНК может функционировать в качестве катализатора, подобно ферменту. Оказалось, что ферменты рибонуклеазы Р содержат 80% РНК, которая и выполняет основную функцию. В других случаях была обнаружена ферментативная активность РНК и в отсутствие белка. Не подлежит сомнению, что это связано со значительной конформационной гибкостью и со сложной третичной структурой РНК. Надо думать, что эти, еще далеко недостаточно изученные, явления существенны для регуляции генов. Вполне возможно, что в клетках функционируют и другие, еще не выявленные виды РНК.

Двойная спираль ДНК замыкается в кольцо в клетках бактерий (например, в *E. coli*), в частицах бактериофагов и т. д. Можно рассматривать ДНК — кольцевую или незамкнутую — на основе модели упругого стержня, характеризуемого двумя энергетическими параметрами — жесткостью на изгиб оси и жесткостью на кручение (см. с. 256). Персистентная длина ДНК велика (с. 228) — двойная спираль обладает высокой жесткостью на изгиб.

§ 7.3. Внутримолекулярные взаимодействия в двойной спирали

Структура двойной спирали ДНК и двуспиральных участков РНК определяется слабыми взаимодействиями — водородными связями, электростатическими и дисперсионными силами.

Свободные азотистые основания образуют водородно связанные комплексы в твердом состоянии. Структуры таких комплексов в ряде случаев установлены. Найдены структуры, отличные от структуры Уотсона — Крика. На рис. 7.12 показано строение пары 9-метиладенин — 1-метилтимин (МА — МТ). Атомы азота N_1 в Т и N_9 в А заблокированы метильными группами для того, чтобы избежать образования дополнительных водородных связей. Мы видим, что атом N_1 МТ образует водородную связь с имидазольным азотом МА. Эта структура отлична от структуры Уотсона — Крика. Возможности образования водородных связей между различными атомами азотистых оснований ДНК, а также таутомерия азотистых оснований существенны для *мутагенеза*. Сильный мутаген — бромурацил (метилированный) изучался в парах с этиладенином и метиладенином. Интересно, что в этих двух близких случаях получаются разные структуры. В первой паре образуются водородные связи O_2—N_6 и N_3—N_7, во второй O_4—N_6 и N_3—N_7.

Примечательно, что в растворах преимущественная ассоциация оснований происходит в согласии с моделью Уотсона — Крика. Водородные связи возникают в парах АУ, АТ и ГЦ, но не в ГУ, АГ и АЦ. Соответственно не удается получить из раствора кристаллы с некомплементарными парами.

Температура плавления двойной спирали, т. е. температура перехода спираль — клубок линейно зависит от содержания ГЦ-пар. Отсюда, однако, не следует, что энергетика двойной спирали всецело определяется водородными связями. При плавлении водородные связи между основаниями заменяются связями с молекулами воды. Поэтому разность энергий водородных связей в спирали и в клубках мала. Должны быть и другие факторы, стабилизующие двойную спираль.

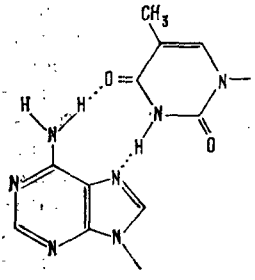


Рис. 7.12. Структура комплекса МА — МТ

Наряду с «горизонтальными» взаимодействиями азотистых оснований в их плоскости в двойной спирали существуют и *«вертикальные» взаимодействия* оснований, принадлежащих соседним парам. Это — взаимодействия между параллельными, а не компланарными основаниями, направленные перпендикулярно к основаниям вдоль оси двойной спирали (stacking).

Азотистые основания представляют собой π-электронные системы. Между плоскими π-электронными циклами, расположенными параллельно друг другу, реализуются значительные дисперсионные взаимодействия. Поэтому плоские молекулы красителей, чья цветность определяется сопряжением π-электронных связей, оказываются способными образовывать полимеры в растворе. Эти полимеры, в которых мономеры связаны дисперсионными силами, обладают особыми оптическими свойствами, так как в них происходит экситонная передача энергии возбуждения. В двойных спиралях полинуклеотидов параллельная упаковка оснований проявляется, в частности, в эффекте гипохромизма (см. § 5.4).

Уже первые теоретические расчеты взаимодействий между азотистыми основаниями в ДНК показали, что ван-дер-ваальсовы (т. е. диполь-дипольные, индукционные и дисперсионные) взаимодействия в паре ГЦ значительно сильнее, чем в АТ. В дальнейшем электростатические взаимодействия были рассмотрены более строго, а также с помощью атом-атомных потенциалов учтены силы отталкивания. Разработан метод расчета энергий горизонтальных и вертикальных взаимодействий, вычисляемых как суммы взаимодействий атомов. Определяется сумма энергий электростатических и поляризационных взаимодействий и энергии отталкивания. Заряды на атомах и связях находятся с помощью приближенных методов квантовой химии. Контролем эффективности методов расчета служат расчеты энергий ряда

молекулярных кристаллов и их сравнение с экспериментальными значениями теплот сублимации. Для нафталина найдено 75,6 кДж/моль (на опыте 72,4), для антрацена 104,2 (на опыте 98,8, 100,0, 104,2). Эти цифры дают представление о порядке величины вертикальных взаимодействий. Наибольшая энергия отвечает двум соседним антипараллельным парам ЦГ, ГЦ. Мы не приводим числовых данных, так как они пока не однозначны и существенно зависят от метода расчета. По-видимому, энергия вертикального взаимодействия меняется для различных пар в пределах 40—60 кДж/моль, что заметно превосходит энергии водородных связей.

Данилов показал, что главный вклад в энергию вертикальных взаимодействий в двойной спирали определяется взаимодействиями вытесненных молекул воды друг с другом.

§ 7.4. Термодинамика плавления двойной спирали

Денатурация нуклеиновых кислот сводится к разрушению двойной спирали (ДНК) или двуспиральных участков (РНК). Нагревание раствора нативной ДНК вызывает разделение двойной спирали на две цепи, сворачивающиеся в статистические клубки. При этом значительно уменьшаются вязкость и оптическая активность, исчезает гипохромизм, т. е. возрастает интенсивность поглощения в области 260 нм. Разделение на две цепи непосредственно доказывается центрифугированием ДНК, содержащей ^{15}N, в градиенте плотности CsCl (ср. с. 82). Клетки *E. coli*, выращенные в среде, содержащей ^{15}N, переносились в среду с обычным ^{14}N. При делении клеток образовывались редуплицированные двойные спирали, в которых одна цепь содержала ^{15}N, другая — ^{14}N. До денатурации наблюдался один пик плотности 1,717 г/см^3, отвечающий двойным спиралям $^{15}N - {}^{14}N$. После денатурации появляются два пика — 1,740 и 1,724 г/см^3, отвечающие однонитчатым клубкам соответственно с ^{15}N и с ^{14}N. Плотность повышается, так как клубки более компактны, чем спираль. М. м. ДНК уменьшается при денатурации вдвое. Образование клубков наблюдается в электронном микроскопе.

Простейшая модель двойной спирали образуется двумя комплементарными цепями гомополинуклеотидов, например, поли-А — поли-У. Эта двойная спираль плавится при 65 °С в 0,15 М растворе NaCl при pH 7,0. Интенсивность полосы поглощения 260 нм увеличивается при плавлении на 34%, а удельное вращение $\varphi_{уд}$ убывает на 275°.

Линейная зависимость температуры плавления ДНК от содержания ГЦ-пар дает при экстраполяции предельные значения $T_{пл} = 69$ °С для поли-АТ и 110 °С для поли-ГЦ, хорошо согласующиеся с экспериментальными значениями для соответствующих синтетических полинуклеотидов (65 и 104 °С). Температура плавления ДНК растет с увеличением ионной силы раствора приблизительно пропорционально логарифму концентрации ка-

тионов. Этот рост понятен — чем выше концентрация катионов, тем в большей степени компенсированы отрицательные заряды фосфатных групп и, следовательно, тем меньше отталкивание между комплементарными цепями.

Плавление ДНК было изучено Доти еще в 1957 г. Явление это своеобразно, ДНК — уникальный пример одномерной упорядоченной структуры с апериодическим распределением звеньев.

Прежде чем обратиться непосредственно к ДНК, целесообразно рассмотреть более простую двойную спираль, построенную из двух комплементарных гомополинуклеотидных цепей. В области перехода спираль — клубок такая молекула состоит из чередующихся спиральных и неупорядоченных участков — петель (рис. 7.13). Если обозначить число разорванных

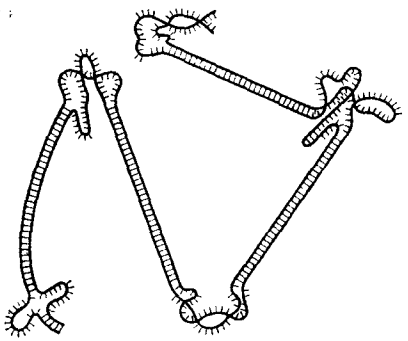


Рис. 7.13. Схема строения полинуклеотида в области перехода спираль — клубок

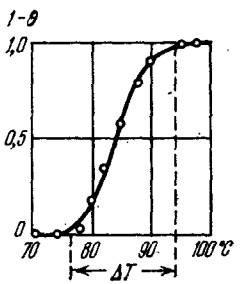


Рис. 7.14. Переход спираль — клубок ДНК

пар N_1, число связанных пар N_2 и число двуспиральных участков, равное числу петель, n, то свободная энергия системы запишется в виде

$$G(N_1,\ N_2,\ n) = N_1G_1 + N_2G_2 + nG_s - TS_0, \tag{7.1}$$

где G_1 и G_2 — свободные энергии полностью разделенных и полностью двуспиральных молекул, отнесенные к одной паре оснований, G_s — свободная энергия, необходимая для возникновения петли, т. е. расплавленной области между двумя спиральными. Наконец, S_0 есть энтропия смешения спиральных и неспиральных участков, т. е. (и расчете на моль)

$$S_0 = R \ln \frac{N_1!}{n!\,(N_1 - n)!} \frac{N_2!}{n!\,(N_2 - n)!}. \tag{7.2}$$

Минимум G при данной температуре соответствует условию

$$\left(\frac{N_1}{n} - 1\right)\left(\frac{N_2}{n} - 1\right) = \frac{1}{\sigma}, \tag{7.3}$$

где $\sigma = \exp(-G_s/RT)$ есть фактор кооперативности (см. с. 101). Чем меньше σ, тем больше кооперативность. Равновесные значения N_1, N_2 и n находятся путем дифференцирования G по N_1, причем $N_2 = N - N_1$, где N — константа. Приравняв $\partial G/\partial N_1$ нулю, получаем

$$\frac{1 - n/N_2}{1 - n/N_1} = s = \exp\frac{G_1 - G_2}{RT}. \tag{7.4}$$

Таким образом, гомополимер в области перехода является последовательностью спиральных и неспиральных участков, размеры которых определяются σ. Это связано с одномерностью системы, которая, согласно *теореме Ландау и Лифшица* (1930), не может разделиться на фазы (с. 104).

Кривая плавления, т. е. зависимость доли неупорядоченных пар $N_1/N = 1 - \theta$ (θ — степень спиральности) от T, идет тем круче, чем меньше σ. При $\sigma = 1$ кооперативность отсутствует, при $\sigma = 0$ кооперативность полная. В середине интервала плавления производная $|d\theta/dT|$ максимальна и интервал определяется условием

$$\Delta T = \frac{1}{|d\theta/dT|_{\max}}. \qquad (7.5)$$

Ход кривой показан на рис. 7.14. Расчет, основанный на модели Изинга (см. с. 73, 101), дает

$$\Delta T = 4\sigma^{1/2}\frac{RT_{\text{пл}}^2}{\Delta H}, \qquad (7.6)$$

где ΔH — разность энтальпий спиральной и неспиральной молекул в расчете на пару оснований. Из экспериментальных значений ΔT для синтетических гомополинуклеотидов получается $\sigma \sim 10^{-4}$—10^{-5}, т. е. $G_s \approx 30$ кДж/моль. Степень кооперативности очень высока.

Как и в случае α-спирали, плавление двойной спирали ДНК представляет собой не фазовый переход, а кооперативное конформационное превращение.

Подробные исследования гетерополимеров, проведенные Лазуркиным, Франк-Каменецким и их сотрудниками, позволили построить теорию, применимую к ДНК и ее комплексам с малыми молекулами. Рассмотрение гетерогенности требует учета двух факторов — различий стабильности пар АТ и ГЦ и добавочного укрепления или ослабления двойной спирали лигандами. Эти факторы влияют по-разному, так как лиганды могут перераспределяться по цепи в процессе плавления, а первичная структура неизменна.

Допустим, что m_1 молекул лиганда связано неспиральными и m_2 — спиральными участками полимера. Вместо (7.1) имеем

$$G(N_1, N_2, n, m_1, m_2) = N_1G_1 + N_2G_2 + nG_s + \\ + m_1g_1 + m_2g_2 - TS_0 - RT\ln\frac{N_1!}{m_1!\,(N_1 - m_1)!}\,\frac{N_2!}{m_2!(N_2 - m_2)!}, \qquad (7.7)$$

где g_1 и g_2 — свободные энергии лигандов соответственно в неспиральных и спиральных участках. Последний член содержит энтропию смешения полимера с лигандами. Условие минимума $\partial G/\partial n = 0$ совпадает с (7.3), т. е. средняя длина спиральных участков при данном θ не зависит от присутствия лигандов. С другой стороны, из условия $\partial G/\partial N_1 = 0$ вместо (7.4) получается

$$\frac{1 - n/N_2}{1 - n/N_1} = s\,\frac{1 - c_1}{1 - c_2} = s^*, \qquad (7.8)$$

где $c_1 = m_1/N_1$, $c_2 = m_2/N_2$. Эти концентрации лигандов выражаются через концентрацию лиганда в растворе c_0 и константы связывания K_1 и K_2 следующим образом:

$$c_1 = \frac{c_0}{1/K_1 + c_0}, \quad c_2 = \frac{c_0}{1/K_2 + c_0}. \qquad (7.9)$$

Кривая плавления гомополимера без лигандов описывается функцией

$$\theta = f(s), \tag{7.10}$$

причем $\theta = 0{,}5$ при $s_{пл} = 1$, т. е. при $G_1 = G_2$. При наличии лигандов

$$\theta = f(s^*) \tag{7.11}$$

и $\theta = 0{,}5$ при $s^* = 1$, т. е. при (см. (7.8))

$$s_{пл} = \frac{1 - c_2}{1 - c_1}. \tag{7.12}$$

Сдвиг температуры плавления по сравнению с таковой для чистого полимера T_0 определяется как

$$\delta\left(\frac{1}{T_{пл}}\right) = \frac{1}{T_0} - \frac{1}{T_{пл}} = \frac{R}{\Delta H} \ln \frac{1 - c_1}{1 - c_2}. \tag{7.13}$$

Изменение интервала температур плавления есть

$$\delta\left(\frac{\Delta T}{T_{пл}^2}\right) = \frac{\Delta T}{T_{пл}^2} - \frac{\Delta_0 T}{T_0^2} = -\frac{R}{\Delta H}\left[\frac{\partial}{\partial\theta} \ln \frac{1 - c_1}{1 - c_2}\right]_{\theta=0,5}. \tag{7.14}$$

Полная концентрация лигандов в растворе и на полинуклеотиде равна

$$c = c_0 + (1 - \theta)\frac{c_1 p}{2} + \theta\frac{c_2 p}{2}, \tag{7.15}$$

где p — концентрация связывающих лиганды фосфатных групп полинуклеотида. Если $c \gg p$, то

$$\delta\left(\frac{1}{T_{пл}}\right) = \frac{R}{\Delta H} \ln\left(\frac{1 + K_2 c}{1 + K_1 c}\right) \tag{7.16}$$

и

$$\delta\left(\frac{\Delta T}{T_{пл}^2}\right) = 0. \tag{7.17}$$

Напротив, при прочном связывании лигандов полимером во всей области перехода, т. е. при $K_1 p \gg 1$ или $K_2 p \gg 1$ и $c \approx p$,

$$\delta T_{пл} = T_{пл} - T_0 = 2\left(\frac{q - 1}{q + 1}\right)\frac{RT_0^2}{\Delta H}\frac{2c}{p}, \tag{7.18}$$

$$\delta\Delta T = \Delta T - \Delta_0 T = 4\left(\frac{q - 1}{q + 1}\right)^2 \frac{RT_0^2}{\Delta H}\frac{2c}{p}, \tag{7.19}$$

где $q = K_2/K_1$.

Таким образом, лиганды действуют в качестве «*скрепок*», стабилизующих двойную спираль.

Опыт подтверждает приведенные соотношения. Уравнение (7.16) описывает, в частности, влияние pH на кривые плавления. С его помощью при высоких ионных силах и нейтральных pH найдены значения $\Delta H = 40$—45 кДж/моль. В качестве лигандов изучались акридиновые красители, ионы щелочных металлов, Ag^+, Cu^+ и т. д. Ионы Ag^+ и Cu^+ преимущественно связываются парами ГЦ в двойной спирали ДНК. Исследования

связывания ионов металлов дали значения ΔH 34 ± 4 при 0,01 М NaCl и 46 ± 8 кДж/моль при 0,1 М NaCl. Указанные определения ΔH согласуются с результатами прямых калориметрических измерений.

Обратимся теперь к плавлению двуспирального гетерополимера. Такое плавление может происходить с образованием больших петель или без их образования (рис. 7.15). Теория разработана для обоих случаев. При беспорядочном распределении

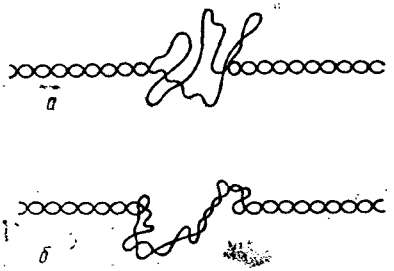


Рис. 7.15. Схема плавления двойной спирали: с образованием петель (*а*) и без образования петель (*б*)

пар АТ и ГЦ получается линейная зависимость $T_{пл}$ от содержания пар ГЦ (ср. с. 233).

Особенность гетерополимера состоит в относительно малом числе микросостояний, отвечающих данной энергии. Маловероятно, чтобы два разных распределения клубков и спиралей по цепи с теми же значениями N_1, N_2 и n имели одинаковую энергию, так как они почти наверняка будут содержать разное число пар ГЦ в расплавленных участках. Поэтому энтропия смешения не может существенно влиять на плавление гетерополимеров. Вместе с тем появляется новый энергетический фактор, определяемый тем, что при уменьшении средней длины расплавленных участков содержание в них более стабильных пар ГЦ должно уменьшаться. Конкуренция этого фактора и фактора, обусловленного невыгодностью «стыков» спиральных и неспиральных участков, должна приводить к чередованию спиральных и неспиральных участков определенной длины при данном значении θ.

Приближенное решение задачи о плавлении гетерополимера с беспорядочной последовательностью пар получено Лазуркиным и Франк-Каменецким. Разделим молекулу на одинаковые отрезки, каждый из которых содержит λ пар. Если λ достаточно велико, то распределение концентрации пар ГЦ по этим отрезкам будет гауссовым, т. е.

$$P_\lambda(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} b_\lambda} \exp\left[-\frac{(x-x_0)^2}{2b_\lambda^2}\right], \qquad (7.20)$$

где $b_\lambda^2 = x_0(1-x_0)/\lambda$, x — содержание пар ГЦ, x_0 — значение x, отвечающее максимуму распределения.

Общее число пар ГЦ в расплавленных участках минимально, если все отрезки с содержанием этих пар, меньшим некоторого предельного значе-

ния x_λ, расплавлены и все отрезки с $x > x_\lambda$ спиральны. Значение x_λ определяется условием

$$\int_0^{x_\lambda} P_\lambda(x)\,dx = \frac{N_1}{N}. \tag{7.21}$$

Средняя концентрация ГЦ в расплавленных участках равна

$$\bar{x}_1 = \int_0^{x_\lambda} xP_\lambda(x)\,dx \left(\int_0^{x_\lambda} P_\lambda(x)\,dx\right)^{-1} = \frac{N}{N_1}\int_0^{x_\lambda} xP_\lambda(x)\,dx. \tag{7.22}$$

Так как состав каждого отрезка не зависит от состава других, вероятность того, что расплавленная область состоит из r отрезков, следующих друг за другом, равна

$$w_r = (1 - N_1/N)(N_1/N)^{r-1}, \tag{7.23}$$

и среднее число отрезков в расплавленной области

$$\bar{r} = (1 - N_1/N)^{-1}. \tag{7.24}$$

Среднее число пар оснований в расплавленной области

$$\bar{m}_1 = \lambda\bar{r} = \lambda(1 - N_1/N)^{-1} \tag{7.25}$$

и число расплавленных областей во всей молекуле

$$n = N_1/(\lambda\bar{r}) = N_1(1 - N_1/N)/\lambda. \tag{7.26}$$

Свободная энергия полимера равна

$$G(N_1, N_2, n) =$$

$$= N_1\left[\bar{x}_1 G_1^{\text{ГЦ}} + (1 - \bar{x}_1)G_1^{\text{АТ}}\right] + N_2\left[\bar{x}_2 G_2^{\text{ГЦ}} + (1 - \bar{x}_2)G_2^{\text{АТ}}\right] + nG_s, \tag{7.27}$$

где G_s — энтропийный вклад, определяемый смешением областей. Вводя условия $N_1 + N_2 = N$, $\bar{x}_1 N_1 + \bar{x}_2 N_2 = x_0 N$, выражая n через λ по (7.26), обозначая $\Delta G_{\text{ГЦ}} = G_1^{\text{ГЦ}} - G_2^{\text{ГЦ}}$, $\Delta G_{\text{АТ}} = G_1^{\text{АТ}} - G_2^{\text{АТ}}$ и отбрасывая постоянные члены, получаем

$$G(N_1, \lambda) = N_1\bar{x}_1\Delta G_{\text{ГЦ}} + N_1(1 - \bar{x}_1)\Delta G_{\text{АТ}} + N_1(1 - N_1/N)G_s/\lambda. \tag{7.28}$$

Здесь $\bar{x}_1$ определено формулой (7.22) с x_λ из (7.21). Равновесные значения N_1 и λ находятся из условия минимума выражения $G(N_1, \lambda)$ по отношению к обеим переменным. Для того чтобы найти среднюю длину спиральной области и интервал плавления гетерополимера ΔT, необходимо рассмотреть выражения (7.21), (7.22) и (7.28) вблизи $N_1 = {}^1/_2 N$, т. е. провести разложение в ряд Тейлора по $z = N_1/N - {}^1/_2$. Пользуясь уравнением (7.20) и вновь отбрасывая постоянные члены, получаем

$$G(N_1, \lambda) = N\left\{z\Delta G - \frac{1}{\sqrt{2\pi}}\left[\frac{x_0(1 - x_0)}{\lambda}\right]^{1/2}(\Delta G_{\text{ГЦ}} - \Delta G_{\text{АТ}})(1 - \pi z^2) + \frac{G_s}{4\lambda}(1 - 4z^2)\right\}, \tag{7.29}$$

где

$$\Delta G = x_0\Delta G_{\text{ГЦ}} + (1 - x_0)\Delta G_{\text{АТ}}. \tag{7.30}$$

Из условия $\partial G/\partial\lambda = 0$ получаем при $z = 0$

$$\lambda_0 = \frac{\pi}{2}\left(\frac{G_s}{\Delta G_{\text{ГЦ}} - \Delta G_{\text{АТ}}}\right)^2 \frac{1}{x_0(1 - x_0)}, \tag{7.31}$$

причем

$$\Delta G_{\text{ГЦ}} - \Delta G_{\text{АТ}} = (T_{\text{ГЦ}} - T_{\text{АТ}})\Delta H_{\text{АТ}}/T_{\text{АТ}}, \tag{7.32}$$

где $T_{ГЦ}$ и $T_{АТ}$ — температуры плавления для соответствующих полимеров. Находим с помощью (7.25)

$$\bar{m}_1 = \pi \left[\frac{T_{АТ}}{\Delta H_{АТ}} \frac{G_s}{T_{ГЦ} - T_{АТ}} \right]^2 \frac{1}{x_0 (1 - x_0)}. \qquad (7.33)$$

Приравняв нулю производную свободной энергии по z при постоянном λ и продифференцировав полученное выражение по T, находим

$$\Delta T = 2 \frac{\pi - 2}{\pi} \frac{\Delta H_{АТ}}{T_{АТ}} \frac{(T_{ГЦ} - T_{АТ})^2}{G_s} x_0 (1 - x_0). \qquad (7.34)$$

Строгое решение задачи отличается от приведенного лишь числовыми множителями. Образование петель при плавлении учитывается добавочным вкладом в G, отвечающим энтропии петель.

Численные расчеты на ЭВМ с использованием в качестве независимых параметров доли пар ГЦ x_0, температур плавления гомополимеров $T_{АТ}$ и $T_{ГЦ}$, а также $\Delta H_{АТ}$ и σ позволили определить кривые плавления, зависимость средней длины спирального

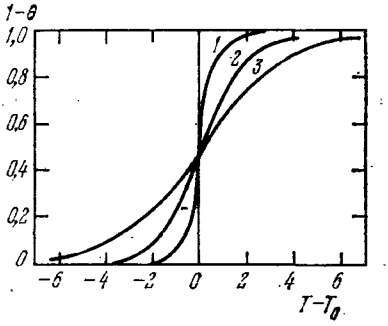


Рис. 7.16. Зависимость $1 - \theta$ полигетеронуклеотида от T: *1* — $x_0 = 0$, $T_{пл} = 340$ К, $N = 2 \cdot 10^4$; *2* — $x_0 = 0{,}1$, $T_{пл} = 344$ К, $N = 4 \cdot 10^4$; *3* — $x_0 = 0{,}5$, $T_{пл} = 360$ К, $N = 6 \cdot 10^4$

участка от степени спиральности θ и зависимость ширины интервала перехода от x_0 при различных значениях указанных параметров. На рис. 7.16—7.18 показаны кривые, полученные при $T_{АТ} = 340$ К, $T_{ГЦ} = 380$ К, $\Delta H_{АТ} = 29$ кДж/моль, $\sigma = 5 \cdot 10^{-5}$, $N = 2 \cdot 10^4 - 10^6$. Линейная зависимость $T_{пл}$ от x_0 получается непосредственно (в К)

$$T_{пл} = T_{АТ} + (T_{ГЦ} - T_{АТ}) x_0 = 340 + 40 x_0. \qquad (7.35)$$

Учет образования петель несколько уменьшает ΔT. Форма теоретической кривой плавления согласуется с опытом практически независимо от модели. Напротив, теоретический график для ΔT существенно зависит от принятой модели и выбранных значений параметров. Все они, кроме σ, находятся из независимых экспериментов. Прекрасное согласие с опытом для ряда типов ДНК получено при $\sigma = 5 \cdot 10^{-5}$. Тем самым, опыт позволяет найти σ. Кооперативность плавления ДНК очень велика.

Определения оптической плотности (и, следовательно, степени спиральности θ) и размеров молекулы ДНК в растворе путем измерения характеристической вязкости в процессе плавления

позволили найти средние длины спиральных участков. В согласии с теорией в области $\theta = 0{,}8—0{,}9$ длины спиральных отрезков варьируют от 1000 до 2500 пар, тогда как в области перехода, т. е. при $\theta = 0{,}5$, получается $m = 400—500$ пар.

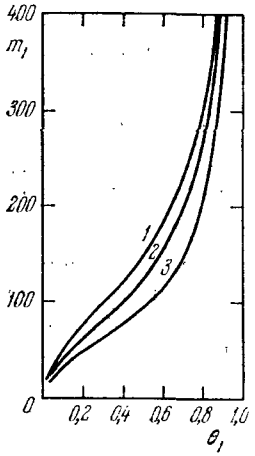


Рис. 7.17. Зависимость среднего числа пар оснований в расплавленных участках от $\theta_1 = 1 - \theta$. Кривые *1*, *2*, *3* для тех же параметров, что и на рис. 7.16

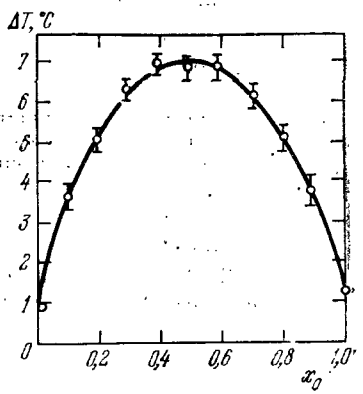


Рис. 7.18. Зависимость интервала температур плавления от концентрации пар ГЦ

Температура плавления понижается и ΔT увеличивается с уменьшением длины цепи.

Термодинамические характеристики плавления ДНК были изучены методами микрокалориметрии (Привалов). Теплота и

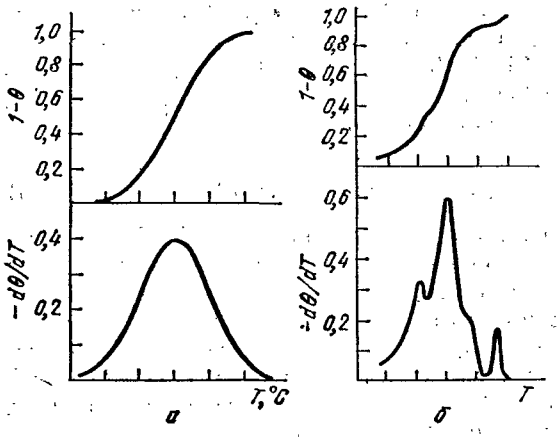


Рис. 7.19. Обычные и дифференциальные кривые плавления ДНК: *а* — гладкие кривые, *б* — с тонкой структурой

температура плавления сильно зависят от pH. При возрастании pH от 7,0 до 9,7 $T_{пл}$ убывает от 84,8 до 66,3 °С, ΔH — от 40,4 до 29,9 кДж/моль, ΔS — от 113 до 88 Дж/(моль · К). При убы-

вании pH от 5,4 до 3,2 $T_{пл}$ убывает от 84 до 55 °С, ΔH от 39,5 до 10,4 кДж/моль, ΔS — от 107 до 52 Дж/(моль · К). Значение $T_{пл}$ зависит и от ионной силы.

Основные результаты теоретических расчетов для реальных молекул ДНК со случайной последовательностью нуклеотидов при физиологических условиях Лазуркин суммирует следующим образом.

1. Ширина интервала плавления $\Delta T = 2{,}5—3$ °С.

2. Зависимость средней длины спирального участка от степени спиральности θ изображается S-образной кривой.

Кольцевые замкнутые ДНК, фигурирующие в фагах и бактериях, вследствие топологической невозможности свободного раскручивания с образованием петель, должны плавиться при более высокой температуре, чем те же ДНК в линейной форме.

Эксперимент подтверждает эти предсказания для ряда бактериофагов. В то же время заметно более высокие значения ΔT для ДНК бактерий (~5 °С) и высших организмов (~10 °С) привели к выводу о блочном строении этих ДНК. Всю ДНК в геноме можно разбить на ряд последовательностей, отличающихся друг от друга средним содержанием ГЦ-пар и имеющих каждая квазислучайную последовательность оснований. Молекулярная масса блоков равна $(5—15) \cdot 10^6$.

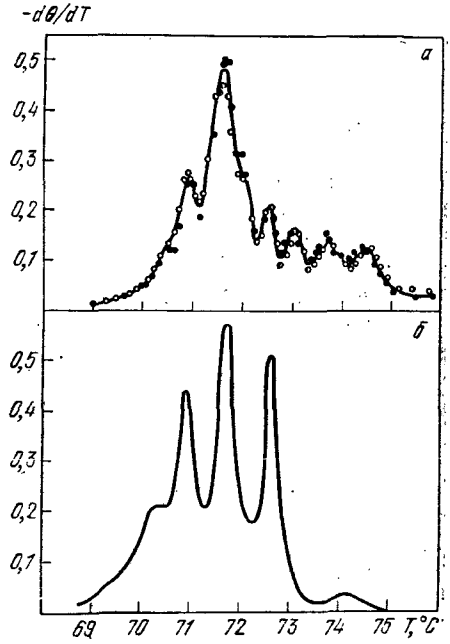


Рис. 7.20. Дифференциальные кривые плавления репликативной двуспиральной формы ДНК фага Ø X174

Увеличение точности оптических измерений позволило обнаружить тонкую структуру кривых плавления. Впервые она наблюдалась у ДНК фага T7. Для выявления тонкой структуры удобно изображать кривые плавления в виде температурной зависимости производной от степени плавления $(1 - \theta)$ по температуре. Это показано на рис. 7.19. Применяются методы графического или машинного дифференцирования кривых плавления или автоматического дифференцирования кривых плавления в ходе измерения. Последнее осуществляется, в частности, измерением разности поглощения света в двух кюветах, температуры которых поддерживаются одинаковыми, но между раство-

рами создана малая разность $T_{пя}$ за счет различия в концентрации соли. Тонкая структура дифференциальной кривой плавления (ДКП) наблюдаема для не слишком длинных двойных спиралей ДНК, она исчезает, если число пар превышает 10^5.

Теория показывает, что каждому пику на ДКП соответствует плавление сравнительно длинного участка, содержание ГЦ-пар которого таково, что его $T_{пя}$ совпадает с температурой опыта. Теория объясняет тонкие особенности ДКП. На рис. 7.20, *а* показана экспериментальная ДКП фага φX174, а на рис. 7.20, *б* — теоретическая ДКП, вычисленная на основе известной последовательности 5375 нуклеотидов в этой ДНК.

§ 7.5. Кинетика расплетания двойной спирали

Мы пока не касались вопросов о скоростях переходов спираль — клубок. Вопросы эти не тривиальны.

Кинетика расплетания двойной спирали ДНК была впервые исследована Куном (1957). Расплетание возникает после разрыва связей между цепями. Если допустить, что оно происходит в результате вращательного броуновского движения, то этот процесс потребует времени τ, гораздо большего, чем наблюдаемое. Так, для ДНК с м. м. $3 \cdot 10^6$ раскручивание 450 витков спирали, что необходимо для полного разделения, требует 150 дней. Между тем τ для ДНК с м. м. порядка 10^8 составляет около 1 мин. Кун рассмотрел разделение цепей, происходящее при сочетании вращательного теплового движения с поступательным, и получил для ДНК с м. м. $3 \cdot 10^6$ τ порядка 1 мин, что также слишком много.

Время расплетания существенно уменьшается, если учесть вращательный момент, возникающий вследствие увеличения энтропии у разделившихся цепей (Лонгет-Хиггинс и Зимм, 1960). Момент этот равен

$$P = \frac{T\Delta S}{\varphi} = \frac{57{,}3}{36} T\Delta S, \qquad (7.36)$$

$\varphi = 36/57{,}3$ — выраженный в радианах угол, на который нужно повернуть конец цепи для освобождения одной пары оснований. Скорость раскручивания, т. е. относительная угловая скорость двух половин спирали, есть $\omega = P/\beta$, где β — коэффициент трения. Для спиралей с м. м. порядка 10^6 τ оказывается порядка секунд. Эта оценка не учитывает необратимости расплетания и перепутывания освободившихся цепей.

Не останавливаясь на других моделях, обратимся к теории, предложенной Фонгом (1964). Перепутывание свободных цепей не должно возникать, если разрыв межцепных связей происходит в средней точке двойной спирали. Две ее половины флуктуируют независимо, половину времени они расплетаются, половину — сплетаются вновь. Однако на начальной стадии разделения ввиду плотной упаковки спирали вторичное скручивание невозможно и

кинетическая энергия сплетающихся цепей превращается в потенциальную, способствующую расплетанию. Если произошло много поворотов, возможно обратное скручивание. Таким образом, две половины спирали беспорядочно скручиваются и раскручиваются без изменения радиуса спирали. Но скручивание не может продолжаться неопределенно долго, и поэтому при таком беспорядочном движении происходит преимущественно расплетание спирали.

Число поворотов $N(t)$ при расплетании меньше или равно начальному числу поворотов спирали N_0. Нужно найти τ из условия

$$\int_0^{\tau} \omega(t)\, dt = -2\pi N_0, \tag{7.37}$$

где $\omega(t)$ — относительная угловая скорость двух половин спирали. Если $N(t) = N_0$, то число развертывающих поворотов равно числу свертывающих, $\omega(t_-) = -\omega(t_+)$. Можно оценить верхний и нижний пределы τ. Среднее значение $\omega(t)$ в некотором интервале времени $\bar{\omega}(t)$ есть монотонно убывающая функция t, так как для расплетания двойной спирали с удвоенным числом оборотов требуется более чем удвоенное время. Нижний предел τ получится при замене $\bar{\omega}(t)$ начальным максимальным значением $\bar{\omega}(0)$. Пусть начальная относительная угловая скорость равна ω_0. Если обе половины спирали развертываются, то $\omega(0) = 2\omega_0$. Так как в момент $t = 0$ ДНК половину времени развертывается, половину — свертывается, то $\bar{\omega}(0) = {}^1/_2\omega(0) = \omega_0$. Эта величина находится из условия

$${}^1/_2 I\omega_0^2 = {}^1/_2 \varkappa T, \tag{7.38}$$

где I — момент инерции половины спирали относительно ее оси. При $N_0 = 2\cdot 10^4$ (м. м. $1{,}2\cdot 10^8$, число пар оснований $2\cdot 10^5$) и $T = 20\,^\circ$C $\omega_0 = 3\cdot 10^8$ рад/с. Нижний предел τ равен

$$\tau_н = 2\pi N_0/\bar{\omega}(0) = 4{,}2\cdot 10^{-4} \text{ с}.$$

Верхний предел, $\tau_в$, отвечает хаотическому свертыванию и развертыванию без преимущества для последнего. Считаем, что двойная спираль ДНК находится в воде при 20 °С. Средний вращательный момент P половины молекулы с м. м. $1{,}2\cdot 10^8$ равен $1{,}34\cdot 10^{-22}$ ед. СГС, момент количества движения молекулы воды $p = 1{,}9\cdot 10^{-18}$ ед. СГС. Умножая p на радиус спирали, находим средний вращательный момент, возникающий вследствие соударения молекул H_2O и ДНК, $p' = 1{,}7\cdot 10^{-25}$ ед. СГС и $P/p' = q = 7{,}8\cdot 10^2$. Для уменьшения P до нуля нужно большое число соударений, равное q^2. Расчет дает $2\cdot 10^{15}$ соударений в 1 с и время, необходимое для q^2 соударений, т. е. для уменьшения момента от P до 0, равно $3\cdot 10^{-10}$ с. Среднее время $\bar{t}$ между двумя последовательными нулями флуктуирующего момента вдвое больше вследствие симметрии флуктуаций во времени. За время $\bar{t}$ угловая скорость не меняет знака и можно рассматривать $\bar{t}$ и число оборотов n за это время как шаг в броуновском блуждании. Имеем $n = \omega_0\bar{t} = 2{,}9\cdot 10^{-2}$ оборотов, и время $\tau_в$ для 10^4 оборотов равно $(10^4/n)^2\bar{t} = 73$ с. При $N \gg 1$ время τ близко к верхнему пределу. Это значение согласуется с опытом. Из расчета следует, что $\tau_н \sim M^3$, $\tau_в \sim M^{3/2}$ (M — молекулярная масса).

Опыт дает для ряда фаговых ДНК $\tau \sim M^2$. Квадратичная зависимость следует непосредственно из того, что τ должно быть пропорционально числу витков, т. е. M, и вязкости среды, т. е. также M. Мэсси и Зимм (1969) исследовали денатурацию ДНК

релаксационными методами и установили зависимость τ от ряда факторов — от вязкости и ионной силы среды, от концентрации ДНК, ее м. м., стадии перехода спираль — клубок. Имеем

$$\tau = b(1 + c[\eta])\,\eta_0 M\psi, \qquad (7.39)$$

где $0 < \psi < 1$ — фактор, характеризующий стадию перехода, c — концентрация ДНК, $[\eta]$ — ее характеристическая вязкость, η_0 — вязкость растворителя, b — константа, зависящая от ионной силы. При малых c значение $\tau \sim M$. Повышение τ от начала перехода к концу показывает, что сопротивление среды возрастает по мере развертывания молекулы. Вследствие образования петель увеличивается эффективный радиус двойной спирали (в теории Фонга это не учитывается).

В действительности кинетика плавления нативной ДНК отвечает целому спектру времен τ. Подлинная теория явления еще не построена и наталкивается на большие трудности при исследовании связи между достижением внутреннего равновесия и расплетанием. Дезорганизованные участки спирали могут «сплавляться» вновь.

Варшавский и Евдокимов изучали расплетание ДНК методом теплового удара. Раствор ДНК нагревался от 5 до 20°С в течение 0,5 с. Кинетические кривые свидетельствуют о наличии не менее двух стадий структурного перехода. В первой, быстрой, стадии исчезает почти весь гипохромный эффект. По-видимому, на этой стадии образуются неподвижные петли, полное расплетание которых происходит на второй стадии. Скорость расплетания следует уравнению Аррениуса (с. 173), энергия активации процесса сильно зависит от pH, имея максимальное значение при промежуточных pH.

Экспериментальное изучение кинетики расплетания позволяет определять дефекты во вторичной структуре ДНК. С этой целью Лазуркин с сотрудниками разработали *кинетический формальдегидный метод* (КФМ).

Если в растворе содержится вещество, реагирующее с локально деспирализованными нуклеотидами и препятствующее поэтому образованию ими уотсон-криковских пар, то реакция будет протекать вплоть до полной деспирализации. Если время связывания такого реагента сильно превышает время раскручивания, то именно эта реакция лимитирует скорость раскручивания. Константа скорости реакции нативной ДНК с реагентом равна $k = k'w$, где w — вероятность разделения для любой пары нуклеотидов в молекуле, а k' — константа скорости реакции разделенных нуклеотидов с реагентом. Если некоторые из оснований нативной ДНК прореагировали и образовали локально денатурированный участок, вероятность тепловой денатурации примыкающих к этому участку пар сильно возрастает, $w' \gg w$. Константа скорости k' соответственно много больше k. Образование локально денатурированного отрезка требует свободной энергии G_s (см. с. 234). Поэтому $k/k' = w/w' \approx \exp(-G_s/RT) = \sigma \sim 10^{-4}$—$10^{-5}$. Так как $k \ll k'$, раскручивание, идущее вначале медленно, постепенно ускоряется и кривая зависимости $1 - \theta$ от времени имеет S-образную форму.

Если двойная спираль имеет дефекты — исходно деспирализованные участки, начальный наклон кривой увеличивается. Кривая показана на

рис. 7.21. Из теории следует формула

$$-\ln \theta = (ky + 2k'c)t + kk't^2, \qquad (7.40)$$

где y — начальные размеры центра расплетания, выраженные в числе пар; $c = \bar{n}^{-1}$ — концентрация дефектов, $\bar{n}$ — среднее число пар в спиральном участке. Зависимость $-\ln \theta/t$ от t прямолинейна и прямая отсекает на оси ординат отрезок

$$z = ky + 2k'c. \qquad (7.41)$$

Формальдегид является таким раскручивающим агентом. Оценим правую часть формулы (7.41). Из опытов с мононуклеотидами следует, что константа скорости реакции k' между основанием и формальдегидом имеет порядок 1 мин$^{-1}$. Следовательно, $k = wk' \sim \sigma k' \sim 10^{-4} - 10^{-5}$ мин$^{-1}$. Значение y неизвестно, но разумно положить его равным нескольким единицам. Итак, $ky \sim 10^{-4}$ мин$^{-1}$. Эта величина лежит ниже предела чувствительности кинетических опытов, ею можно пренебречь по сравнению с $2k'c$, так как $k' \gg k$, а c имеет порядок единиц. Таким образом,

$$z = 2k'c. \qquad (7.42)$$

Константа k' находится из опытов с фрагментированной ДНК по формуле (7.42) — в этих случаях c известно. Порядок величины k' — 2,5 мин$^{-1}$. Наименьшее значение z, которое может быть измерено, $-3 \cdot 10^{-4}$ мин$^{-1}$.

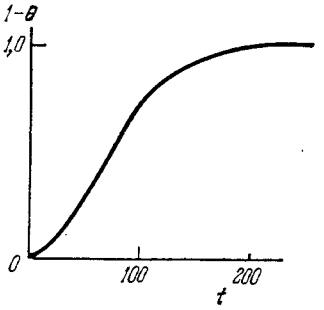


Рис. 7.21. Кинетическая кривая для ДНК с дефектами (t — в условных единицах)

Иными словами, КФМ позволяет определять минимальную концентрацию дефектов c порядка одного дефекта на 10^4 пар нуклеотидов. Метод очень чувствителен. Он с успехом применяется для изучения ДНК с разрывами, вызванными ультрафиолетовым облучением или ферментативным гидролизом и т. д. Нативная ДНК оказывается практически лишенной дефектов, что опровергает зигзагообразную модель с резкими изломами. КФМ применим к изучению комплексов ДНК с РНК-полимеразой и тонкой структуры ДНК.

Денатурированные, клубкообразные одиночные цепи ДНК способны ренатурироваться, вновь образовывать двойную спираль. *Ренатурация* ДНК была открыта и изучена Мармуром и Доти (1961). При медленном охлаждении, т. е. «отжиге», денатурированной ДНК частично восстанавливаются и биологическая активность (рис. 7.22), и гипохромный эффект. Ренатурация происходит и после быстрого охлаждения, «закалки», денатурированной ДНК, если вновь подвергнуть такой образец нагреванию до температуры, несколько меньшей $T_{пл}$. За ренатурацией удобно следить по изменению плотности с помощью седиментации в градиенте плотности CsCl (см. с. 82, 233). Например, плотность нативной ДНК равна 1,704 г/см^3, у денатурированной и закаленной в этом состоянии она составляет 1,716, у ренатурированной — 1,700 г/см^3. Ренатурация сильно зависит от температуры; оптимальной для ренатурации является температура, достаточно высокая для развертывания клубков и вместе с тем достаточно

низкая для стабилизации двойной спирали. ДНК из *Diplococcus pneumoniae* ренатурируется при 67 °С в 2,5 раза быстрее, чем при 80 и 50 °С.

Ренатурация легко проходит у фаговой ДНК, несколько труднее у бактериальной и практически неосуществима у ДНК высших организмов. Это понятно — если бы образцы ДНК, полученные из тимуса теленка, клеток *E. coli* и фага Т2, все имели м. м. 10^7, то число различных молекул ДНК, приходящееся на одну клетку (или частицу фага), составило бы соответственно 10^6, 10^2, 10. При одинаковой весовой концентрации эти три образца имели бы весьма различающиеся концентрации комплементарных цепей, и вероятность встречи двух таких цепей, возникших при денатурации ДНК в образце, полученном из клеток высшего организма, была бы очень мала.

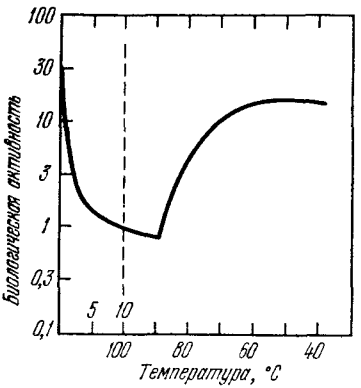
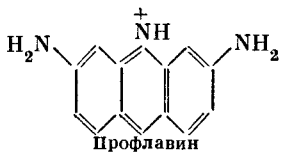


Рис. 7.22. Ренатурация ДНК. Числа над абсциссой 5 и 10 — время выдерживания образца при 100 °С

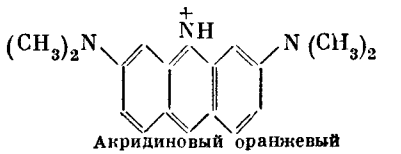
Ренатурация позволяет получать гибридные двойные спирали из ДНК различного происхождения. Получены гибриды ДНК, выделенных из различных штаммов *E. coli*, и межвидовые бактериальные гибриды. Гибридизация ДНК вскрывает эволюционно-генетические связи между бактериями.

§ 7.6. Взаимодействие двойной спирали с малыми молекулами и ионами

Исследование взаимодействия ДНК и РНК с малыми молекулами важно для познания структуры нуклеиновых кислот и ее изменений. Малые молекулы в ряде случаев существенно влияют на биологическую функцию ДНК и РНК. Одни из них являются мутагенами, другие ингибируют транскрипцию (см. § 8.8). К мутагенам относятся, в частности, *акридиновые красители*, например:



Профлавин



Акридиновый оранжевый

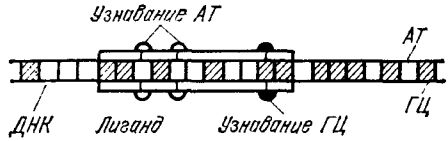
С другой стороны, молекулы белков, которые также малы по сравнению с ДНК, связываясь с ДНК, регулируют основные молекулярно-генетические процессы.

Теория адсорбции малых молекул на ДНК развивалась Крозерсом и Гурским и Заседателевым.

Предположим, что биологически активный лиганд связывается некоторым числом пар оснований ДНК. Рассмотрим равновесное связывание лигандов полимером, представляющим беспорядочную последовательность пар АТ и ГЦ. Лиганд может содержать функциональные группы, часть которых специфически взаимодействует с парами оснований. Пусть α — длина лиганда, $q_{АТ}$ и $q_{ГЦ}$ — числа центров на молекулу лиганда, узнающих АТ- и ГЦ-пары. Каждый центр присоединяется к одной паре.

Предположим, что лиганд адсорбируется полимером, если все его центры узнавания связываются с соответствующими парами оснований. Схема такого присоединения показана на рис. 7.23. Значения α, $q_{АТ}$, $q_{ГЦ}$ и константы связывания K могут быть определены из экспериментальной кривой

Рис. 7.23. Схема узнавания двойной спирали ДНК молекулой лиганда



связывания путем ее сравнения с теоретической изотермой, вычисленной с помощью компьютера. Более простая процедура состоит в теоретическом расчете эффективных констант связывания $K_{эф}$, числа связывающих центров $n_{эф}$ и уровня насыщения для связывания r_{max}. Вычисленные значения сравниваются с экспериментальными с помощью графика Скатчарда (рис. 7.24). Имеем

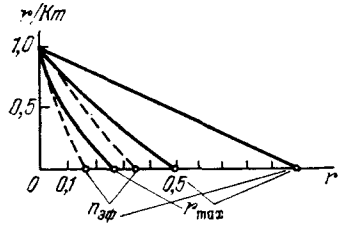


Рис. 7.24. Графики зависимости r/Km от r

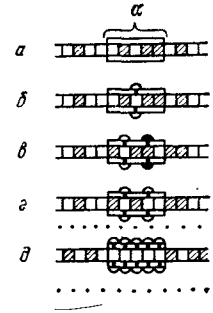


Рис. 7.25. Значения параметра ψ (см. текст)

$$r_{max} = \lim_{m\to\infty} r, \quad K_{эф} = \left|\lim_{r\to 0} \frac{d(r/m)}{dr}\right|, \quad n_{эф} = \frac{\lim\limits_{r\to 0}(r/m)}{K_{эф}}, \qquad (7.43)$$

где r — молярное отношение числа связанных лигандов к числу пар оснований ДНК, m — концентрация свободного лиганда в растворе.

Статистическая механика приводит к следующим значениям:

$$r_{max} = \frac{n}{1+\psi/2}, \quad K_{эф} = K(1+\psi), \quad n_{эф} = \frac{n}{1+\psi}, \qquad (7.44)$$

где

$$n = x^{q_{АТ}}(1-x)^{q_{ГЦ}}. \qquad (7.45)$$

Здесь x — доля пар АТ в полимере, K — истинная константа ассоциации. Параметр ψ учитывает уменьшение числа возможных положений на полимере для второй молекулы лиганда вследствие присутствия первой молекулы. Связывание последовательных лигандов происходит не независимо. Значения параметра ψ показаны на рис. 7.25 ($а$) $l_{АТ} = 0$, $l_{ГЦ} = 0$; $\psi = 2(\alpha - 1)$; $б$) $l_{АТ} = 1$, $l_{ГЦ} = 0$; $\psi = 2(\alpha - 1)x$; $в$) $l_{АТ} = 1$, $l_{ГЦ} = 1$; $\psi = 2(\alpha - 2)x(1 - x)$; $г$) $l_{АТ} = 2$, $l_{ГЦ} = 0$; $\psi = 2x + 2(\alpha - 2)x^2$; ...; $д$) $l_{АТ} = \alpha$, $l_{ГЦ} = 0$; $\psi = 2\sum_{i=1}^{\alpha-1} x^i$; ...).

Таким образом, например, в случае гомополимера, когда связывание не зависит от отношения АТ/ГЦ, получаем

$$K_{эф} = K(2\alpha - 1), \quad n_{эф} = \frac{1}{2\alpha - 1}, \quad r_{max} = \frac{1}{\alpha}. \qquad (7.46)$$

Различие между $n_{эф}$ и r_{max} количественно объясняется на основе принятой модели. Длина лиганда α может быть определена из экспериментальных значений $n_{эф}$ и r_{max}. Из изотерм связывания этидиумбромида, спермина, актиномицина и нетропсина двойной спиралью ДНК получены значения α, равные соответственно 2, 4, 5 и 5 парам оснований. Эти значения близки к ожидаемым на основе молекулярных размеров лигандов.

Меньшие молекулы типа акридиновых красителей либо прослаиваются между парами оснований в двойной спирали ДНК (модель *интеркаляции* Лермана), либо располагаются в узкой бороздке на поверхности двойной спирали (модель Гурского). По-видимому, встречаются как одни, так и другие комплексы. Эти вопросы обсуждаются далее на с. 290—292.

§ 7.7. Редупликация ДНК

При делении клеток генетический материал удваивается, происходит редупликация двойной спирали ДНК. В принципе возможны три механизма редупликации: *консервативный* с сохранением исходной двойной спирали и построением дочерней двойной спирали, тождественной исходной; *полуконсервативный*, при котором две дочерних двойных спирали содержат каждая по одной новой и по одной старой цепи; и, наконец, *дисперсный* механизм с распределением исходного материала между четырьмя цепями двух дочерних двойных спиралей. Месельсон и Сталь (1958) изучали редупликацию ДНК при делении клеток *E. coli* с помощью меченых атомов и седиментации в градиенте плотности CsCl. Была получена популяция клеток, меченных ^{15}N. Эти клетки переносились в среду, содержавшую ^{14}N, но не ^{15}N, и в ней делились. Из исходной популяции, из популяций «детей» и «внуков» извлекались молекулы ДНК и определялись их плотность и радиоактивность. Исходная ДНК, меченная ^{15}N, имела наибольшую плотность, ДНК «детей» оказалась меченной наполовину и ее плотность равнялась среднему арифметическому плотностей ^{15}N-ДНК и ^{14}N-ДНК. Наконец, ДНК «внуков» разделилась при седиментации на две зоны — зону с ДНК, тождественной дочерней, меченной наполовину, и на зону с немеченной

ДНК. Схематически это можно представить так:

$$^{15}N\text{-}^{15}N \rightarrow 2^{15}N\text{-}^{14}N \rightarrow 2^{15}N\text{-}^{14}N + 2^{14}N\text{-}^{14}N.$$

Эти результаты согласуются с полуконсервативным механизмом. Он подтверждается и другими данными.

Редупликацию ДНК удалось наблюдать *in vitro* (Корнберг, 1960). Бралась инкубационная смесь, содержащая все четыре нуклеозидтрифосфата (АТФ, ГТФ, ТТФ, ЦТФ), ионы Mg^{2+} (6×10^{-3} М), полимеризующий фермент, выделенный из клеток *E. coli*, и нативную ДНК (из тимуса теленка) в качестве матричной затравки; pH 7,5. В такой системе ДНК редуплицируется — получаются молекулы, тождественные затравочным. Процесс не идет в отсутствие одной из компонент или при предварительной обработке затравочной ДНК дезоксирибонуклеазой — ферментом, разрушающим ДНК. С помощью нуклеотидов, меченных ^{32}P, показано, что синтез ДНК является поликонденсацией мономеров — при включении одного нуклеотида в цепь выделяется одна молекула пирофосфата $H_4P_2O_7$. Согласно закону действия масс, реакция тормозится при добавлении избытка пирофосфата. Если его количество в 100 раз превышает общее количество трифосфатов, скорость реакции уменьшается вдвое. Вновь полученная ДНК обладает биологическими свойствами исходной. Так, при синтезе с затравкой ДНК фага φX174 получается ДНК, имеющая инфицирующее действие — синтезируются частицы фага. С помощью полимеризующего фермента ДНК-полимеразы удается получать синтетические полидезоксирибонуклеотиды, образующие двойные спирали при наличии комплементарности:

—А—Т—А—Т—А—Т—А—Т—
—Т—А—Т—А—Т—А—Т—А—

и

—Г—Г—Г—Г—Г—Г—Г—Г—
—Ц—Ц—Ц—Ц—Ц—Ц—Ц—Ц—

Изменение свободной энергии при образовании двух двойных спиралей из одной исходной двойной спирали и нуклеозидтрифосфатов можно представить в виде

$$\Delta G = N(2E_1 + \bar{E}_2) - T\Delta S, \qquad (7.47)$$

где N — число нуклеотидов в цепи, E_1 — энергия, выделяемая при включении одного нуклеотида в цепь, $\bar{E}_2$ — среднее значение энергии, выделяемой в результате взаимодействий, стабилизующих уотсон-криковскую пару. Энергия $\bar{E}_2$ зависит от относительного содержания x пар ГЦ:

$$\bar{E}_2 = xE_{\text{ГЦ}} + (1-x)E_{\text{АТ}}. \qquad (7.48)$$

Изменение энтропии ΔS определяется заменой нуклеозидтрифосфата (НТФ) на пирофосфат (ФФ) в растворе и утратой нуклеотидом, включившимся в двойную спираль, вращательных и по-

ступательных степеней свободы. Этот последний фактор запишем в виде $\varkappa \ln q$. В целом

$$\Delta S = -2N\varkappa \ln\left(q\frac{c_{\text{НТФ}}}{c_{\text{ФФ}}}\right), \tag{7.49}$$

где $c_{\text{ФФ}}$ — концентрация ФФ в растворе, $\bar{c}_{\text{НТФ}}$ — средняя концентрация НТФ, равная $\left(c_{\text{А}}^{(1-x)}c_{\text{Т}}^{(1-x)}c_{\text{Г}}^{x}c_{\text{Ц}}^{x}\right)^{1/2}$, $c_{\text{А}}$, $c_{\text{Т}}$, $c_{\text{Г}}$, $c_{\text{Ц}}$ — концентрации соответствующих НТФ. Если они равны друг другу, то $\bar{c}_{\text{НТФ}} = {}^1/_4 c_{\text{НТФ}} = c_{\text{А}} = c_{\text{Т}} = c_{\text{Г}} = c_{\text{Ц}}$. Условие редупликации состоит в выделении свободной энергии

$$2E_1 + \bar{E}_2 + 2\varkappa T \ln\left(q\frac{\bar{c}_{\text{НТФ}}}{c_{\text{ФФ}}}\right) \geqslant 0. \tag{7.50}$$

Величины E_1 и $\bar{E}_2$ равны примерно 16 и 20 кДж/моль. Величина $q = Z_1'Z_2/Z_1Z_2'$, где Z_1 и Z_1' — статистические суммы для НТФ в растворе и для НТФ, присоединенного к матрице водородными связями, Z_2 и Z_2' — статистические суммы для ФФ в растворе и ФФ, входящего в НТФ и присоединенного к матрице. Оценка дает $q \sim 10^{-2}$.

При 300 К условие редупликации (7.50) выполняется, пока $c_{\text{ФФ}}/c_{\text{НТФ}}$ не превысит 400. В клетках и в системах для синтеза это отношение миого меньше. Условие (7.50) выполняется, если хватает количества НТФ. Редупликации, если она не идет, могут препятствовать не термодинамические, но кинетические причины.

Аналогичное рассмотрение денатурации (§ 7.4) приводит к значению разности свободных энергий разделенных цепей и двойной спирали, равному

$$\Delta G' = N\bar{E}_2 - 2N\varkappa T \ln q', \tag{7.51}$$

где q' характеризует изменение собственной энтропии цепи, приходящееся на один нуклеотид. Можно приравнять q' числу конформаций звена одиночной цепи. В звене содержится пять единичных связей, вращению вокруг каждой из них отвечают две — три конформации. Порядок величины q' 10—100. Из (7.51) следует, что температура перехода спираль — клубки равна

$$T_{\text{пл}} = \frac{\bar{E}_2}{2\varkappa \ln q'} = \frac{E_{\text{АТ}}}{2\varkappa \ln q'} + x\frac{E_{\text{ГЦ}} - E_{\text{АТ}}}{2\varkappa \ln q'}. \tag{7.52}$$

Экспериментальная зависимость $T_{\text{пл}}$ (в К) от x

$$T_{\text{пл}} = 342 + 41x$$

получается при $E_{\text{АТ}} = 19{,}7$, $E_{\text{ГЦ}} = 22{,}3$ кДж/моль и $q' = 32$.

Эти грубые расчеты пригодны лишь для оценок порядков величин ΔH и ΔS.

Редупликация требует, конечно, расплетания исходной двойной спирали. Репликативный синтез идет с непременным участием ДНК-*полимеразы*, которая, по-видимому, перемещается вдоль

двойной спирали, расплетая ее и синтезируя новые цепи (модель «застежки-молнии»). Бактериофаг φX174 содержит не двуспиральную, а однонитчатую ДНК. Установлено, однако, что размножение этого фага идет через репликативную стадию, в которой ДНК становится двуспиральной. И в этом случае реплицируется именно двойная спираль. Это относится и к РНК вирусов, при редупликации которых возникает промежуточная двуспиральная структура. Однонитчатая ДНК фага φX174 кольцеобразна, как и двуспиральные ДНК других фагов и бактерий. В упомянутых выше опытах Корнберга (с. 249) эта ДНК служила затравкой. Между тем только кольцевая ДНК биологически активна, т. е. обладает инфекционностью. Корнберг воспользовался другим ферментом — *лигазой* для замыкания новой цепи. Новые цепи строились не с тимином, а с бромурацилом. Для выделения синтетической ДНК препарат кратковременно обрабатывался ДНК-азой так, чтобы примерно у половины молекул происходил один разрыв в кольце. В результате получалась смесь, содержащая в равных количествах матричные кольца, синтетические кольца, матричные и синтетические незамкнутые ДНК, а также двойные кольца без разрывов. Методом седиментации в градиенте плотности выделялись синтетические кольца, содержащие бромурацил. Эти кольца оказались способными инфицировать клетки *E. coli*. Ранее было установлено, что замена уже одного из 5500 нуклеотидов ДНК из фага φX174 приводит к утрате инфекционности. Следовательно, синтез Корнберга абсолютно точен.

По-видимому, расплетание двойной спирали ДНК при одновременной редупликации (а также при транскрипции — при синтезе мРНК, см. § 8.3) должно происходить не так, как при денатурации. Выигрыш свободной энергии при образовании новых цепей обусловливает появление значительного вращающего момента. Полимераза, перемещающаяся вдоль двойной спирали, создает локальные условия, нарушающие баланс взаимодействий между цепями. Предположительно она препятствует гидрофобным взаимодействиям оснований.

Элементарная модель для рассмотрения кинетики редупликации ДНК — одномерная матрица, на которой сорбируются НТФ, причем с одного конца идет практически необратимая их поликонденсация. Грубые оценки показывают, что диффузия НТФ из раствора к матрице протекает быстрее процессов на матрице и скорость синтеза лимитируется ферментативным процессом. В согласии с опытом расчет показывает, что синтез должен идти без индукционного периода.

Проведем теоретическое рассмотрение, следуя модели Манилова (1969). Имеем матрицу из N ячеек. Центр роста (полимераза) перемещается от первой до N-й ячейки. Синтез необратим, т. е. перемещение полимеразы от $i-1$-й к i-й ячейке происходит вдали от равновесия. Константа скорости роста k_r для любой ячейки одна и та же, константа скорости инициирования k_0 много меньше k_r. Уход полимеразы из N-й ячейки происходит быстро и не лимитирует процесс. Задача сводится к рассмотрению необратимого блуждания в одномерной системе. Кинетические уравнения имеют

вид

$$\begin{aligned} \dot{w}_1 &= k_0 - k_r w_1, \\ &\cdots\cdots\cdots \\ \dot{w}_i &= k_r w_{i-1} - k_r w_i, \\ &\cdots\cdots\cdots \\ \dot{w}_N &= k_r w_{N-1}, \end{aligned} \tag{7.53}$$

где $i = 2, 3, \ldots, N-1$, w_i — вероятность того, что фермент находится в i-й ячейке. Среднечисленная степень полимеризации равна

$$\bar{n}(t) = \sum_{i=1}^{N} i w_i(t) \left[\sum_{i=1}^{N} w_i(t) \right]^{-1}. \tag{7.54}$$

При начальных условиях $w_1(0) = \ldots = w_N(0) = 0$. Решение системы (7.53) с помощью преобразования Лапласа — Карсона имеет вид

$$\begin{aligned} w_i(t) &= \frac{k_0}{k_r} \sum_{j=i}^{\infty} f(j), \quad i = 1, 2, \ldots, N-1, \\ w_N(t) &= k_0 t \sum_{j=N-2}^{\infty} f(j) - (N-1) \frac{k_0}{k_r} \sum_{j=N-1}^{\infty} f(j), \\ f(j) &= (k_r t)^j \frac{\exp(-k_r t)}{j!}. \end{aligned} \tag{7.55}$$

Получаем

$$2k_r \bar{n}(t) = 2k_r t \sum_{j=0}^{N-3} f(j) + (k_r t)^2 \sum_{j=0}^{N-4} f(j) + 2Nk_r t \sum_{j=2}^{\infty} f(j) - N(N-1) \sum_{j=1}^{\infty} f(j). \tag{7.56}$$

При $k_r t \ll 1$ вероятность $w_i \to 0$, $w_N \to 0$, $\bar{n} \to 1$, т. е. синтеза нет. При $k_r t \gg 1$ находим $w_i \to k_0/k_r$, $w_N \to k_0 t$, $\bar{n} \to N$, т. е. синтез идет до конца. Константа скорости $k_r = p k_l$, где p — вероятность того, что ячейка, находящаяся перед центром роста, содержит адсорбированный мономер, а k_l — константа скорости его включения в растущую цепь. Так как процесс не лимитируется диффузией, p имеет равновесное значение и выражается изотермой Ленгмюра (ср. с. 209)

$$p = a/(K + a), \tag{7.57}$$

где $K = \exp(E/\kappa T)$, E — энергия сорбции, $a = \exp(\mu/\kappa T)$ — абсолютная активность НТФ в растворе, μ — химический потенциал НТФ. Так как $\mu = \mu^0 + \kappa T \ln(\gamma c)$, $a = Ac$, $A = \gamma \exp(\mu^0/\kappa T)$, где γ — коэффициент активности, c — концентрация НТФ, μ^0 — стандартный химический потенциал. При $p \ll 1$ величина $a/K \ll 1$ и

$$p = a/K = Ac \exp(-E/kT), \tag{7.58}$$

$$k_r = k_l A c \exp(-E/kt). \tag{7.59}$$

Необходимо резкое увеличение c, чтобы перейти от малого к большому значению $\bar{n}$. Такое увеличение вряд ли происходит во время деления клетки. С другой стороны, зависимость $\bar{n}$ от E оказывается S-образной и достаточно малого изменения E для полного синтеза, что может определяться кооперативностью процесса — взаимодействием соседних нуклеотидов на матрице.

Приведенная трактовка эквивалентна рассмотрению, основанному на теории абсолютных скоростей реакций (см. с. 174). Константу скорости реакции i-мера, включающего в цепь сразу два нуклеотида, можно записать в виде

$$k = \frac{\kappa T}{h} p. \tag{7.60}$$

Экспериментальные значения для скорости синтеза ДНК равны для *E. coli* $1{,}8 \cdot 10^3$, для клеток лимфомы мышей $2 \cdot 10^2$ мономеров в секунду. Отсюда следует для *E. coli* $p = 2{,}8 \cdot 10^{-10}$, для лимфомы мышей $p = 3{,}1 \cdot 10^{-11}$. Оценка свободной энергии активации, относящейся к адсорбции НТФ, но не к включению нуклеотида в цепь, дает для *E. coli* $G^+ = 54{,}5$, для мыши 34,9 кДж/моль. Эти величины находятся через константу равновесия активированного комплекса n-мера с двумя нуклеотидами:

$$G^+ = -RT \ln K^+ = -RT \ln (p/nc^2). \qquad (7.61)$$

Изложенная теория, конечно, является упрощенной, она не учитывает ни гетерогенности матрицы, ни кооперативности процесса. Тем не менее, она дает разумное полуколичественное описание матричного синтеза.

Ферментативный синтез полинуклеотидов может идти и без матрицы. В этом случае полимер получается после латентного периода, продолжительность которого убывает с ростом концентрации фермента. Так идет, например, синтез поли-АТ. Если в качестве затравки введен олигомер, то лаг-период быстро убывает с его длиной. Даже короткие олигомеры могут служить матрицами для растущего полимера, который с матрицы соскальзывает. Соответствующая кинетическая теория позволяет получить зависимость времени синтеза полимера от его длины и от скорости отделения цепи от матрицы, на которой она растет. Эта скорость резко убывает при длине олигомера, превышающей 4 нуклеотида. По-видимому, это критический размер матрицы, при котором новая цепь может образовывать с матрицей двойную спираль.

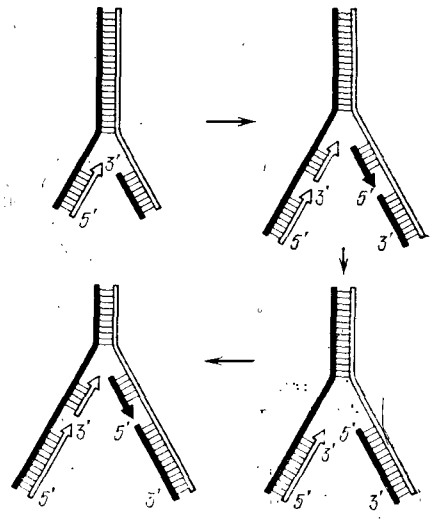


Рис. 7.26. Схема репликации ДНК по Оказаки

Новая ДНК синтезируется *in vitro* всегда в направлении $5' \to 3'$. Вместе с тем, имеются данные, указывающие, что *in vivo* редуплицируются обе цепи — одна в направлении $5' \to 3'$, другая в направлении $3' \to 5'$. Оказаки (1968) объяснил это прерывным механизмом редуплицированного синтеза. Короткие отрезки новой ДНК синтезируются на одной или на обеих цепях в точке репликации, всегда в направлении $5' \to 3'$ (рис. 7.26). Далее эти отрезки соединяются, образуя новые цепи. Если модель правильна, то последние реплицированные участки одной или обеих дочерних цепей могут быть отделены. Временное селективное ингибирование фермента, катализирующего накопление фос-

фодиэфирных связей между цепями ДНК, должно приводить к накоплению новых коротких цепей. Эти предсказания подтверждаются экспериментами, показавшими, что меченный тритием тимидин включается в короткие цепи, которые лишь позднее объединяются в длинные.

Точный механизм редупликации ДНК *in vivo* тем не менее нельзя считать установленным. Репликация *in vivo* начинается на определенной стадии развития клетки с участием факторов, по-видимому, связанных с клеточной мембраной (модель *репликона*).

§ 7.8. Топология ДНК

Как указано в гл. 3, имеется далеко идущая аналогия между броуновским движением частицы и полимерной цепью. Различие сводится к тому, что в полимерной цепи невозможны самопересечения, так как нельзя пространственно совместить два разных атома. Это обстоятельство находит свое выражение в объемных эффектах (§ 3.5). Той же телесностью полимерной цепи определяются особенности поведения кольцевых полимеров, в частности кольцевой формы ДНК.

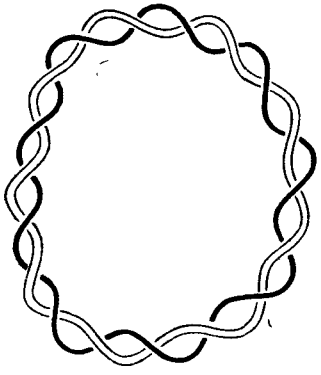


Рис. 7.27. Кольцевая замкнутая форма ДНК

Кольцевая замкнутая (КЗ) форма типична для ДНК простейших, а также для цитоплазматической ДНК животных. Большинство вирусных ДНК в ходе заражения клеток проходят стадию КЗ-формы. Эта форма представлена на рис. 7.27. Как легко видеть, каждая из двух комплементарных цепей двойной спирали замкнута, и в результате цепи оказываются зацепленными. В КЗ-форме ДНК возникают топологические ограничения, состоящие в том, что порядок зацепления двух комплементарных цепей строго ограничен. Эти ограничения, конечно, исчезают при разрыве хотя бы одной из цепей.

КЗ-форма характеризуется *порядком зацепления* — топологическим инвариантом. Порядок зацепления двух комплементарных цепей Lk — алгебраическое число пересечений одной цепью поверхности, натянутой на вторую цепь. В случае, изображенном на рис. 7.27, $Lk = 9$; в реальных случаях Lk имеет порядок 10^2. Величина

$$\tau = Lk - N/\gamma_0 \qquad (7.62)$$

называется *числом супервитков* КЗ ДНК. Здесь N — число пар оснований в ДНК, γ_0 — число пар оснований, приходящихся на один виток двойной спирали линейной ДНК. В обычной B-форме ДНК $\gamma_0 = 10$. Если $\tau \neq 0$, КЗ ДНК находится в суперспирализо-

ванной форме. Величина τ всегда отрицательна, отрицательна и плотность супервитков, определяемая как $\sigma = 10\tau/N$. Опытные значения $-\sigma$ — от 0,03 до 0,10. Суперспиральная ДНК в КЗ-форме показана на рис. 7.28. Установлено, что отрицательная суперспирализация необходима для нормального функционирования

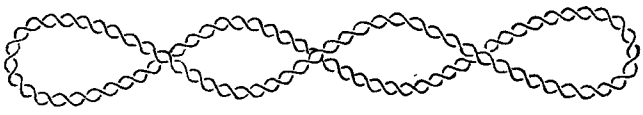


Рис. 7.28. Суперспиральная КЗ-форма ДНК

КЗ ДНК в клетке. Без суперспирализации не происходит репликация ДНК. В клетках существует специальный фермент (*ДНК-гираза*), создающий указанную отрицательную суперспирализацию. При такой суперспирализации в ДНК облегчается образование расплетенных участков, в которых комплементарные цепи не закручены относительно друг друга. Наличие расплетенных участков уменьшает напряжение в двойной спирали и повышает ее сродство к РНК-полимеразе и т. д.

Число витков суперспирали определяется различными способами — косвенно по связыванию лигандов и непосредственно методом гель-электрофореза. Этот метод очень чувствителен, он позволяет определить молекулы, у которых τ разнятся всего лишь на единицу.

В связи с открытием и изучением КЗ ДНК приобрела значительную актуальность так называемая *теория узлов и зацеплений* (ТУЗ). В ТУЗ разработаны методы расчета статистических интегралов для замкнутых цепей. В этих случаях область интегрирования должна ограничиваться лишь той частью фазового пространства, которая отвечает топологически эквивалентным состояниям системы. Для этой цели были развиты численные, машинные методы, использующие классификацию возможных узлов и зацеплений.

Величина Lk является инвариантом при конформационных перестройках КЗ ДНК, при которых сохраняется непрерывность обеих нитей ДНК. Информацию о конформационных и энергетических свойствах КЗ ДНК дают опыты, в которых Lk изменяется. Такие изменения происходят под действием особых ферментов — топоизомераз. Некоторые из них изменяют топологию КЗ ДНК путем разрыва и воссоединения одной из нитей двойной спирали. С помощью гель-электрофореза удалось установить получающееся в этих условиях распределение молекул КЗ ДНК по величине Lk. Максимум равновесного распределения всегда отвечает $\tau = 0$. Распределение нормальное, для $N \geqslant 3000$ справедлива эмпирическая формула

$$P(\tau) \sim \exp(-1000\,\tau^2/N).$$

Из этих опытов найдена зависимость свободной энергии КЗ ДНК от числа витков суперспирали:

$$G \approx -RT \ln P(\tau) \approx 1000\,RT\tau^2/N.$$

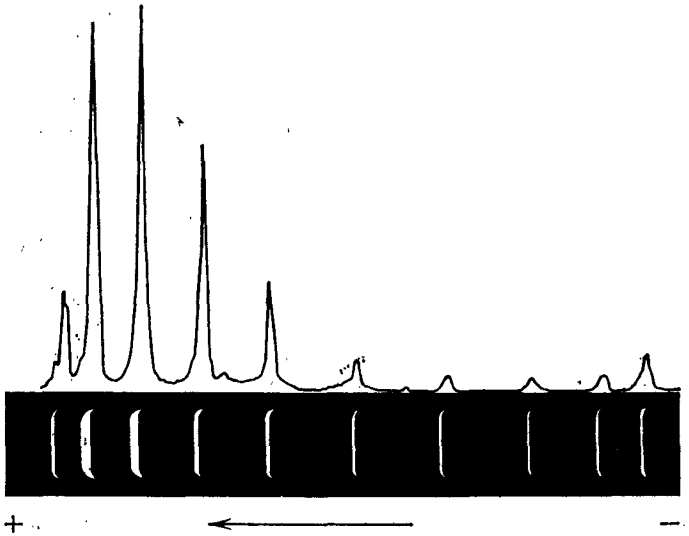


Рис. 7.29. Разделение топоизомеров ДНК методом гель-электрофореза. Над электрофореграммой — денситограмма геля

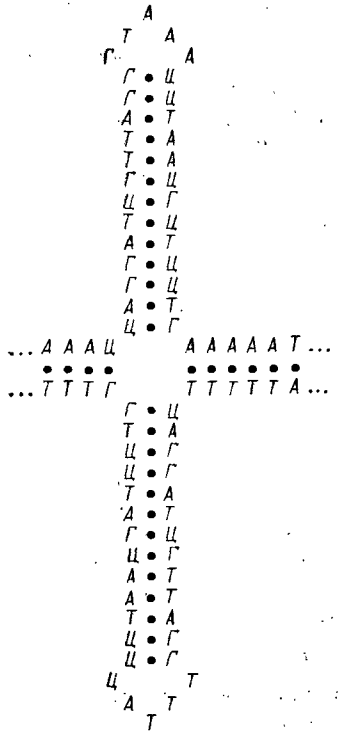


Рис. 7.30. Крестообразная структура ДНК

Из тех же данных на основе теоретических соображений впервые определена жесткость двойной спирали ДНК на кручение — торсионная жесткость. Она оказалась равной

$$g = 0{,}036\,RT,$$

что отвечает среднеквадратичной амплитуде тепловых флуктуаций в значении угла φ между соседними парами оснований, равной 5°. К близким значениям приводят данные по кинетике деполяризации красителя, связанного с ДНК.

Что касается жесткости двойной спирали ДНК на изгиб, то она может быть охарактеризована величиной персистентной длины, равной 57 ± 10 нм.

Сверхспиральная ДНК обладает высокой устойчивостью, ее температура плавления повышена и интервал плавления расширен. Примечательна независимость ширины этого интервала от относительной устойчивости пар АТ и ГЦ. Это было показано в опытах, в которых плавление сверхспиральной ДНК изучалось в присутствии 3 М бромида тетраэтиламмония и в присутствии 7,3 М $NaClO_4$. В первом случае температура плавления для АТ- и ГЦ-пар совпадает ($T_{ГЦ} - T_{АТ} \approx 0\,°C$), во втором — сильно различается ($T_{ГЦ} - T_{АТ} \approx 56\,°C$). Однако кривые плавления сверхспиральной ДНК в обоих случаях одинаковы. Теория, трактующая цепи ДНК как тонкие ленты, объясняет эти эффекты.

На рис. 7.29 показано разделение молекул ДНК, отличающихся числом сверхвитков, методом гель-электрофореза. Это ДНК плазмиды (см. с. 268), содержащей 1683 пары нуклеотидов.

В ДНК существуют *палиндромные участки* — перевертыши, одинаково читаемые с обоих концов (пример такого палиндрома в языке: ПИЛВИНООНИВЛИП).

Как показали Вологодский, Франк-Каменецкий, Аншелевич и Лукашин, в сверхспиральных ДНК в палиндромных участках возможно возникновение крестообразных структур, подобных изображенной на рис. 7.30. Это теоретическое предсказание было далее подтверждено экспериментально.

Отрицательная сверхспирализация, наряду с крестообразными структурами, стабилизует и *Z*-форму ДНК.

Хромосомная ДНК, как правило, сверхспирализована. Как это было впервые показано в лаборатории Георгиева в 1982 г. (Лучник и Бакаев), сверхспирализация ДНК играет важную роль в биологической активности генома. Различные нуклеотидные последовательности в молекуле ДНК конкурируют за упругие витки и энергию сверхспирализации, поглощая их в конформационных переходах. Было установлено напряженное состояние ДНК в транскрипционно-активном хроматине вируса SV40. Конформационные изменения, связанные с этими напряжениями, имеют прямое значение для регуляции генов. Сверхспирализация генома изменяется при дифференцировке, старении и злокачественной трансформации клеток.

Глава 8

ФИЗИКА БИОСИНТЕЗА БЕЛКА

§ 8.1. Проблема генетического кода

Ген есть часть макромолекулы ДНК, ответственная за синтез одной белковой цепи. ДНК содержит информацию о первичной структуре белка — генетическую информацию. Она записана в первичной структуре ДНК, т. е. в последовательности нуклеотидов. В вирусах РНК-типа генетическая программа заложена в молекулах РНК.

Каково соответствие между последовательностью нуклеотидов в ДНК и РНК и последовательностью аминокислотных остатков в белковой цепи? В этом и состоит проблема генетического кода.

Это физическая проблема. Во-первых, ставится вопрос о соответствии информационного содержания ДНК и белка, во-вторых,— о количественных взаимоотношениях между нуклеотидами и аминокислотами, определяемых в конечном счете взаимодействиями молекул в матричном синтезе белка — молекулярным узнаванием. В-третьих, возникает вопрос о физическом смысле генетического кода, в-четвертых, о его эволюционном происхождении.

Проблема генетического кода была впервые сформулирована физиком (Гамов, 1953) и ряд физиков принял участие в ее решении. Однако код был расшифрован не физическими, но биологическими и химическими методами.

Белковый текст написан алфавитом из двадцати букв, текст ДНК (или РНК) — из четырех. Из элементарных соображений следует, что кодовое отношение, т. е. число нуклеотидов, кодирующих один аминокислотный остаток, не может быть меньше трех. В самом деле, число сочетаний из 4 по 2 равно $4^2 = 16 < 20$, число сочетаний из 4 по 3 равно $4^3 = 64 > 20$.

Гамов предположил, что белковая цепь собирается непосредственно на двойной спирали ДНК, причем каждая аминокислота располагается в выемке между четырьмя нуклеотидами. Эта выемка имеет примерно ромбическую форму. Два нуклеотида принадлежат одной цепи, два — другой. Один из нуклеотидов первой цепи образует уотсон-криковскую пару с нуклеотидом второй цепи. «Бубновый код» Гамова обеспечивает именно 20 «букв». Каждая «буква», т. е. ромб, состоит из четырех нуклеотидов. Число сочетаний из 4 по 4 равно $4^4 = 256$. Но имеются ограничения, так как малая диагональ ромба обязательно соединяет A с T

или Г с Ц. Если считать тождественными правые и левые формы ромбов, например,

$$\begin{matrix} \text{Г} & & \text{Г} \\ \text{A}\cdots\text{T} & \equiv & \text{T}\cdots\text{A}, \\ \text{A} & & \text{A} \end{matrix}$$

то получится лишь 20 различных ромбов.

«Бубновый код» перекрывающийся. Так как в каждый ромб входят нуклеотиды из трех последовательных пар, два нуклеотида, находящихся на одной стороне ромба, являются общими для двух соседних ромбов. Тем самым возникает корреляция между двумя соседними аминокислотными остатками. За данным остатком может следовать не любой из 20, но лишь некоторые. Однако дальнейшие исследования показали, что перекрывающийся код нельзя согласовать с опытом, так как любой аминокислотный остаток может следовать за любым. Отсутствие корреляции делает невозможной теоретическую, умозрительную расшифровку кода.

Невозможность перекрывающегося кода следует также из отсутствия мутационных замещений двух соседних аминокислотных остатков в белке. Мутация нуклеотида, общего для двух соседних остатков, должна приводить к такому двойному замещению.

Кодовое отношение было найдено экспериментально в результате генетического исследования, проведенного Криком с сотрудниками (1961), изучавшими область *r*II генома фага Т4, размножающегося в культурах *E. coli*. Было установлено, что мутации в этой области, вызываемые акридиновыми красителями, состоят в выпадении, *делеции*, нуклеотидов и в их добавлении. Дикий тип *w* размножается на штаммах *B* и *K*12 *E. coli*. Мутанты *r* размножаются только на *B*-штаммах, образуя резко очерченные бляшки. Некоторые из мутантов этого типа способны спонтанно возвращаться к дикому типу *w*. Генетический анализ показал, что такие ревертанты возникают не в результате обратной мутации $r \rightarrow w$, но вследствие появления второй супрессорной мутации $w \rightarrow r$ вблизи первой. Каждая из двух мутаций порознь приводит к утрате способности синтезировать соответствующий белок, но сочетание двух мутаций в одном гене эту способность восстанавливает. Всего было изучено около 80 *r*-мутантов, в том числе двойные и тройные их комбинации — супрессоры супрессоров и супрессоры супрессоров супрессоров. Все супрессоры оказались относящимися к двум классам: + (добавление нуклеотида) и − (делеция). Если исходная мутация *r* есть +, то ее супрессор −, и наоборот. Дикий фенотип дают комбинации +−, −+, +++, −−−, но не ++, −−, ++++, −−−−.

Эти факты объясняются, если допустить, что код триплетный, неперекрывающийся и «читаемый» подряд, начиная с некоторого фиксированного нуклеотида. Представим цепь ДНК последовательностью букв АВСАВС... (рис. 8.1, *а*). На месте каждой буквы может находиться любой из четырех нуклеотидов А, Т, Г, Ц. Чтение кода, начиная с определенной буквы, эквивалентно нало-

жению на эту последовательность рамки с прорезью. Если одна из букв выпала (—) или, напротив, добавилась новая (+), то вся последовательность, начиная с места мутации, искажена, т. е. нормальный белок дикого типа не может синтезироваться (рис. 8.1, *б*, *в*). Если появилась супрессорная мутация (—+ или

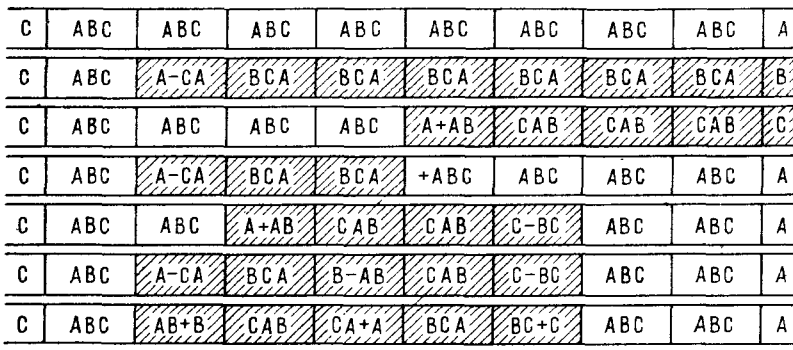


Рис. 8.1. Тексты ДНК: *а* — дикий тип, *б* — мутант (делеция), *в* — мутант (добавление), *г*, *д* — двойные мутанты типа + —, *е* — тройной мутант — — —, *ж* — тройной мутант + + +. Заштрихованы искаженные участки текста

+—), то последовательность искажена лишь в области между двумя мутациями (рис. 8.1, *г* и *д*). Если искаженная область не слишком длинна, то синтезируемый белок может сохранить свою функцию и будет наблюдаться *реверсия*. Рис. 8.1, *е*, *ж* поясняют реверсии при трех однотипных мутациях: ——— и +++. Понятно также почему двойные, четверные и пятерные однотипные мутации не дают реверсий.

Из этих результатов следует *кодовое отношение*, кратное трем. Естественно предположить, что оно равно именно трем. В дальнейшем это было подтверждено прямым изучением первичной структуры синтезированного белка. «*Мутации сдвига рамки*» (frame shift mutations) наблюдаются и для гена фага Т4, продуцирующего лизоцим. Оказалось, что «сдвиги рамки» действительно искажают белковый текст. Двойной ревертированный мутант лизоцима отличается от дикого типа последовательностью пяти остатков:

Дикий *w*-тип ... Тре Лиз Сер Про Сер Лей Асн Ала ...
Ревертант
(псевдо-*w*-тип) ... Тре Лиз Вал Гис Гис Лей Мет Ала ...

Эти генетические исследования привели к решению ряда физических вопросов. Установлено кодовое отношение, доказана коллинеарность кода, доказано, что код читается, начиная с определенного нуклеотида, и не имеет запятых, т. е. материальных элементов, разделяющих *кодоны*. Кодонами называются тройки следующих друг за другом нуклеотидов, кодирующие аминокислотные остатки. Общее число разных кодонов равно $4^3 = 64$.

В связи с этим встал вопрос о *вырождении кода*. Так как общее число кодонов (64) больше числа аминокислот (20), то нужно выяснить, сколькими различными кодонами кодируется каждый остаток. Слово «вырождение» употребляется здесь в физическом, а не в биологическом смысле.

Исследование мутаций сдвига рамки непосредственно свидетельствует о вырождении кода. Вернемся к только что изображенным фрагментам лизоцима. Если код не вырожден, то оба кодона для Гис в ревертанте должны быть одинаковыми. Обозначим их АВСАВС. Если сдвиг вызывается добавлением нуклеотида слева и кодон для Про есть ВСА, то соотношение между диким типом и ревертантом изобразится так:

... Про Сер ...
... А ВСА ВСА ...
... АВС АВС ...
... Гис Гис ...

Но отсюда следует, что кодон для Сер есть также ВСА. Противоречие снимается, лишь если имеются различные кодоны для Гис.

Вырождение кода доказывается и тем, что при значительных вариациях в составе ДНК различных организмов (доля Г + Ц

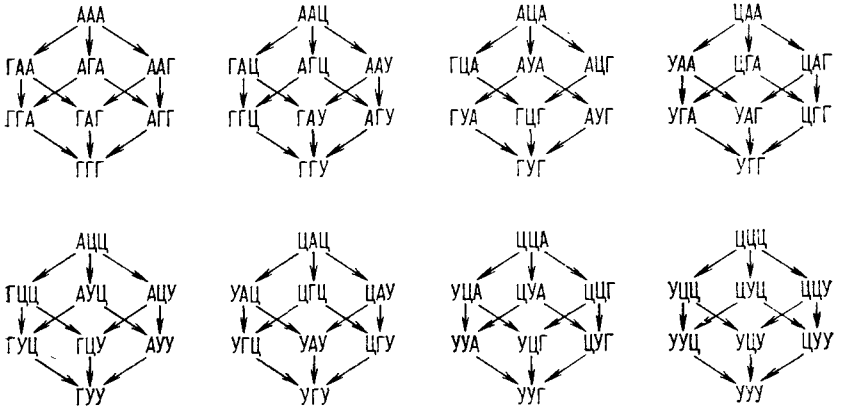


Рис. 8.2. Октеты кодонов

варьирует от 25 до 75%) средний состав белков меняется мало. Вместе с тем ряд факторов указывает на универсальность кода.

О вырожденности кода свидетельствует и исследование мутаций, как индуцированных химическими агентами, так и спонтанных. Азотистая кислота вызывает замещение аминной группы на гидроксильную:

$$-NH_2 + HNO_2 \rightarrow -OH + N_2 + H_2O.$$

Тем самым, нитрит превращает Ц в У, Г в ксантин и А — в гипоксантин. После репликации ксантин и гипоксантин замещаются на Г. Следовательно, происходят замены Ц → У и А → Г. 64 триплетных кодона можно представить восьмью октетами (Виттман). На рис. 8.2 изображены эти октеты, стрелками показаны нитритные точечные мутации. Наблюдаемые замещения в белке вируса

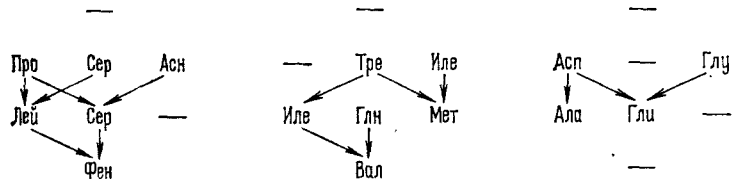


Рис. 8.3. Отнесение аминокислотных остатков к октетам на основании нитритных мутаций ВТМ

табачной мозаики (ВТМ) располагаются по тем же октетам. Виттман установил, что по крайней мере Сер или Иле (рис. 8.3) должны кодироваться несколькими триплетами, т. е. код вырожден. Эти данные одновременно показывают, что бóльшая часть замещений в белке происходит в результате замены одного нуклеотида в кодоне.

В дальнейшем эти положения были многократно подтверждены. Генетический код является триплетным, неперекрывающимся, лишенным запятых и вырожденным. Код универсален для всех организмов, начиная с вирусов и кончая человеком. (Впрочем, недавно установлено, что при синтезе цитохромоксидазы в митохондриях код несколько отличен от универсального — см. с. 279.) Полная расшифровка кода потребовала прямых биохимических опытов, ставших возможными лишь в результате раскрытия механизма биосинтеза белка.

§ 8.2. Биосинтез белка

Само существование фиксированной первичной структуры у белковой цепи доказывает, что в клетке должна быть заложена программа построения этой структуры. «Текст» не может возникнуть в результате случайных встреч аминокислот — подобно типографскому тексту он должен «набираться» на некоторой матрице. Это понимал уже Кольцов задолго до открытия роли нуклеиновых кислот. Он считал, что роль матрицы, ответственной за синтез белка, играет также белок. Сейчас мы знаем, что матрицами служат молекулы ДНК и РНК. Для «набора текста» необходим генетический код. Матричный принцип биосинтеза белка является основным для молекулярной биологии и молекулярной биофизики.

Информация, содержащаяся в генах, т. е. в ДНК, передается мРНК в процессе *транскрипции*. Синтез белка происходит

именно на мРНК. Так называемая «*центральная догма*» молекулярной биологии выражается схемой передачи генетической информации

$$\text{ДНК} \rightarrow \text{РНК} \rightarrow \text{Белок.} \qquad \text{(А)}$$

Информация никогда не может быть передана от белка к нуклеиновой кислоте.

В 1970 г. была открыта *обратная транскрипция* — передача генетической информации от РНК к ДНК (Темин, Балтимор)

$$\text{РНК}' \rightarrow \text{ДНК} \rightarrow \text{РНК} \rightarrow \text{Белок.} \qquad \text{(Б)}$$

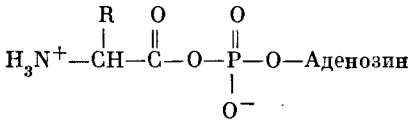
Существование обратной транскрипции (см. § 8.3) никак не противоречит «центральной догме». В действительности это, конечно, не догма, а закон природы.

Матричная, или информационная, РНК переносит генетическую информацию от *хромосом*, в которых она хранится, к *рибосомам*, на которых и реализуется биосинтез. Для биосинтеза необходим исходный материал — аминокислоты — и выполнение надлежащих термодинамических и кинетических условий.

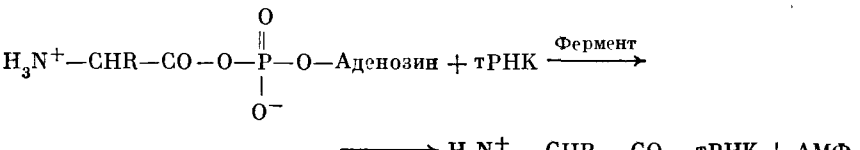
Аминокислоты фигурируют в клетке в свободном виде. Их прямая поликонденсация является эндергоническим процессом — она сопровождается увеличением свободной энергии примерно на 12 кДж/моль при образовании пептидной связи. В клетке поликонденсация аминокислот сопряжена с экзергонической реакцией дефосфорилирования АТФ (см. с. 40). Аминокислота вступает в реакцию биосинтеза в активированной форме:

$$\text{Аминокислота} + \text{АТФ} \xrightarrow{\text{Фермент}} \text{Аминоациладенилат} + \text{ФФ}$$

(ФФ — пирофосфат). Аминоациладенилат, в котором аминокислота активирована, имеет строение



Фермент аминоацил-тРНК-синтетаза катализирует и реакцию образования аминоациладенилата, и перенос активированной таким образом аминокислоты на конец молекулы-адаптора тРНК. Схема этой второй реакции имеет вид



Для каждой аминокислоты существует одна или несколько специфических тРНК (см. § 8.4).

Биосинтез белка происходит на рибосомах. Рибосомы представляют собой нуклеопротеидные частицы, состоящие из белков и *рибосомальных* РНК (рРНК). Рибосомы обеспечивают надлежащее взаимодействие мРНК с тРНК, несущими аминокислоты, и поликонденсацию аминокислот в полипептидную цепь. Организующая роль рибосомы подобна ферментативной (см. § 8.5).

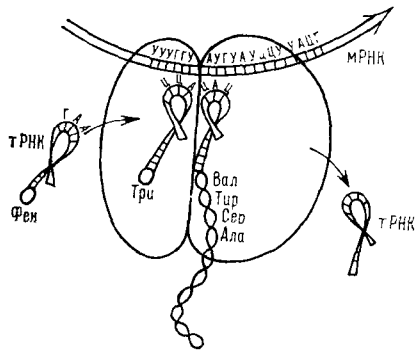


Рис. 8.4. Схема присоединения АК — тРНК к мРНК в рибосоме

Рибосома присоединяется к 5′-концу мРНК, кодирующему N-конец полипептидной цепи. Рибосома движется вдоль цепи мРНК, «читая текст» кодон за кодоном таким образом, что кодоны в комплексе мРНК — рибосома последовательно присоединяют тРНК, связанные с аминокислотами (тРНК — АК). Каждая тРНК, несущая аминокислоту, комплементарно взаимодействует с кодоном мРНК своим *антикодоном*. Антикодон — триплет, комплементарный кодону мРНК. Схема процесса показана на рис. 8.4. В данной рибосоме происходит последовательное присоединение двух тРНК — АК к n-му и $(n+1)$-му кодонам мРНК. Образуется пептидная связь между соответствующими аминокислотами, растущая белковая цепь переносится с n-й тРНК — АК на $(n+1)$-ю, n-я тРНК отделяется и рибосома, несущая $(n+1)$-ю тРНК с присоединенной к ней растущей цепью, перемещается на один кодон. В новом положении рибосома взаимодействует уже с $(n+1)$-м и $(n+2)$-м кодонами мРНК. Вдоль одной цепи мРНК перемещается не одна, а ряд рибосом, на каждой из которых растет своя белковая цепь. Система мРНК — рибосомы, похожая на нитку с бусами, называется *полисомой*. Таким образом, на одной цепи мРНК синтезируется ряд одинаковых белковых цепей. Синтез белковой цепи на полисоме есть *трансляция* — перевод нуклеотидного текста в аминокислотный, происходящий с помощью генетического кода, т. е. кодоно-аминокислотного словаря. Общая схема синтеза белка показана на рис. 8.5.

Таким образом, белковая цепь синтезируется *de novo* из аминокислот, а не из заранее существующих полипептидных блоков. Далее из цепи (или из нескольких цепей) собирается биологически функциональная молекула белка.

Описанная последовательность событий при биосинтезе сложна, но все ее этапы характеризуются единым принципом, лежащим в основе молекулярной биофизики. Этот принцип — *молеку-*

лярное узнавание, реализуемое посредством слабых взаимодействий (см. с. 58). В биосинтезе участвуют четыре типа нуклеиновых кислот — ДНК, мРНК, рРНК и тРНК. «Узнают» друг друга нуклеотиды комплементарных цепей ДНК, нуклеотиды

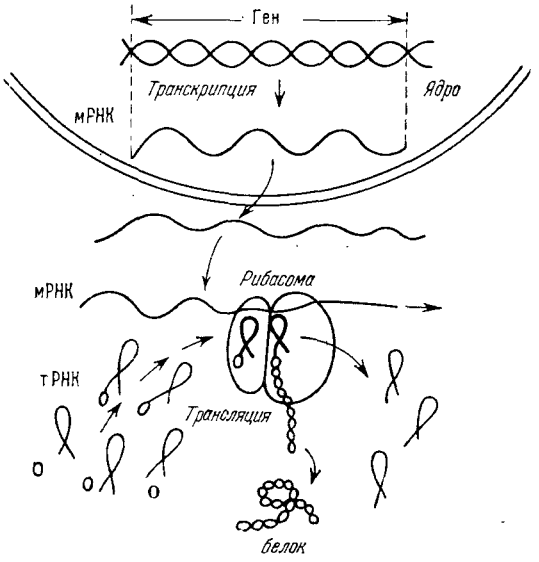


Рис. 8.5. Общая схема синтеза белка

ДНК и мРНК, кодоны мРНК и антикодоны тРНК. Узнавание реализуется и при взаимодействиях нуклеиновых кислот с ферментами и рибосомами.

Таблица 8.1. **Константы ассоциации K (моль$^{-1}$) при спаривании оснований в неполярных растворителях C_6H_6 и CCl_4 при 25 °С**

	У	А	Ц	Г
У	15 *45*	*550*	*50*	$<$*10*^{3}
А	150	8 *22*	*50*	$<$*10*^{3}
Ц	$<$28	$<$28	28 *50*	$>$*10*^{3}
Г	$<1{,}12\cdot10^3$	$<1{,}2\cdot10^3$	$3\cdot10^4$	$1{,}2\cdot10^3\sim$*10*^{3}

Исследовались *2′-*, *3′-*, *5′-* О-замещенные рибонуклеозиды; прямой шрифт — значения K в C_6H_6, курсив — в CCl_4.

Точность узнавания азотистых оснований демонстрируется табл. 8.1. Комплементарные пары АУ и ГЦ оказываются действительно наиболее прочными; так, АУ значительно прочнее АА или УУ. Однако возможно образование и некомплементар-

ных пар, что и является одной из важнейших причин возникновения мутаций.

Изучение ассоциации олигонуклеотидов показало, что наиболее благоприятно для биологической функции спаривание триплетов. Дублеты обладают слишком низкими значениями K, квартеты дают, напротив, слишком сильное связывание. Время жизни пары кодон — антикодон не должно превышать нескольких миллисекунд, так как в противном случае оно будет лимитировать скорость работы биосинтетической системы.

Таким образом, сложная игра слабых сил приводит к образованию сильных химических пептидных связей. Образование химических связей и механические процессы — перемещение фермента *РНК-полимеразы* вдоль цепи ДНК (см. § 8.3), работа рибосомы и ее перемещение вдоль цепи мРНК (см. § 8.5) требуют затраты энергии. Источниками энергии для этих процессов служат макроэргические нуклеозидтрифосфаты АТФ и ГТФ.

Далее стадии биосинтеза белка и их участники рассматриваются более подробно.

§ 8.3. Транскрипция и обратная транскрипция

Транскрипция текста ДНК в текст РНК, т. е. синтез РНК на матрице ДНК, происходит с помощью РНК-полимеразы. Транскрибируется текст лишь одной из двух цепей, образующих двойную спираль ДНК. РНК-полимераза имеет сложную структуру. Этот фермент выполняет ряд функций: узнавание начального локуса синтеза и специфическое связывание ДНК в этом локусе, инициацию синтеза РНК, синтез РНК, терминацию синтезируемой цепи и уход фермента с матрицы.

При малых ионных силах РНК-полимераза — димер с м. м. около 10^6 и константой седиментации 23 S. При ионных силах, бо́льших 0,1 М, фермент обратимо распадается на два мономера 13 S. Мономер 13 S состоит из четырех субъединиц: β (м. м. 15 000), β' (165 000), двух α (по 40 000) и σ-фактора (80 000). Сложное строение полимеразы связано с многообразием функций этого фермента.

РНК-полимераза более активна с двуспиральной, чем с однонитчатой ДНК. Транскрипция *in vivo* происходит с двуспиральной ДНК, хотя, как уже сказано, «считывается» одна цепь. Соответственно в точке роста цепи РНК происходит локальное расплетание двойной спирали. С помощью формальдегидного метода, позволяющего обнаруживать дефекты в двойной спирали ДНК, действительно было обнаружено ее расплетание при взаимодействии с ферментом. Скорости синтеза РНК *in vivo* и в оптимальных условиях *in vitro* близки и составляют 20—30 нуклеотидов в секунду.

Таким образом, при транскрипции происходит конформационное превращение ДНК — расплетание. РНК-полимераза располагается на ДНК очень редко и эти превращения захватывают лишь малую часть длинной двойной спирали. Можно, однако,

изучать конформационные свойства комплексов РНК-полимеразы с малыми отрезками ДНК. Такие комплексы получаются при обработке комплекса ДНК с полимеразой ферментом ДНК-азой.

Флорентьев и Иванов предложили модель действия РНК-полимеразы (1970). При росте цепи РНК происходит связывание *3′*-гидроксила рибозы с *5′*-фосфатом атакующего нуклеотида Предполагается, что при расплетании ДНК и возникновении гибридной двойной спирали ДНК — РНК матрица ДНК функционирует не в обычной *B*-форме, а в *A*-форме. При каждом шаге транскрипции новое основание «извлекается» из матрицы ДНК и дезоксирибонуклеотид, комплементарный рибонуклеотид которого лишился пирофосфата, поворачивается назад в ДНК с восстановлением водородных связей. Ось гибридной двойной спирали движется вдоль двойной спирали ДНК винтовым способом с одновременным перемещением фермента. На рис. 8.6 показана схема двуспиральной ДНК и растущего конца РНК при действии РНК-полимеразы. Энергетика транскрипции сводится к сопряжению экзергонических и эндергонических стадий. В сущности речь идет об ЭКВ — о взаимодействии химических и конформационных степеней свободы. Модель согласуется с экспериментальными данными.

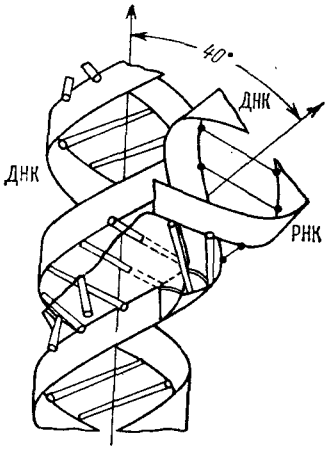


Рис. 8.6. Структура двуспиральной матрицы ДНК и растущего конца РНК при действии РНК-полимеразы

РНК-направляемый синтез ДНК или обратная транскрипция, открытая как один из этапов размножения РНК-содержащих опухолеродных вирусов (см. с. 263), имеет большое значение для молекулярной биологии и молекулярной биофизики. Обратная транскрипция также происходит с непременным участием фермента, названного Энгельгардтом *ревертазой*. Ревертаза обладает тремя функциями: ДНК-полимеразной, обеспечивающей синтез однонитчатой комплементарной ДНК (кДНК) на матрице РНК, полимеразной функцией, обеспечивающей синтез второй нити ДНК, *анти*ДНК, образующей с кДНК двойную спираль, и рибонуклеозидной активностью, гидролизующей РНК в двойной спирали РНК — ДНК. Ревертаза осуществляет свои функции с любыми РНК.

Структуры ревертаз — белков значительного размера — пока не установлены. Нативная ревертаза онкорнавирусов птиц имеет константу седиментации 7,5 S. Ревертазы обладают четвертичной структурой.

И ДНК-полимеразы, и РНК-полимеразы, и ревертазы обязательно содержат ионы Zn^{++} в качестве кофакторов. Это лишний

раз свидетельствует о важности бионеорганической химии для биологии.

Важная проблема молекулярной биологии и молекулярной биофизики состояла в «чтении текстов» нуклеиновых кислот. Решение этой проблемы сыграло существенную роль в возникновении *генной инженерии* — в практических применениях науки о генах. Задача генной инженерии — искусственное перераспределение генов и построение новых генов с целью создания новых белковых веществ и организмов, с целью получения нужных для медицины и сельского хозяйства белков в удобных для производства системах, таких, например, как культуры *E. coli*.

В начале 50-х годов Ледерберг открыл *плазмиды* — относительно малые циклические молекулы ДНК, содержащиеся в большинстве бактерий. Плазмиды существуют независимо от хромосомы бактериальной клетки и размножаются при делении клеток. Бактерии могут обмениваться плазмидами. Разработана техника извлечения плазмид из бактерий, интродукции в плазмиды чужеродной ДНК. Если примешать такие гибридные плазмиды к бактериальным клеткам, то они смогут хотя бы частично в этих клетках размножаться и производить в них чужеродные белки.

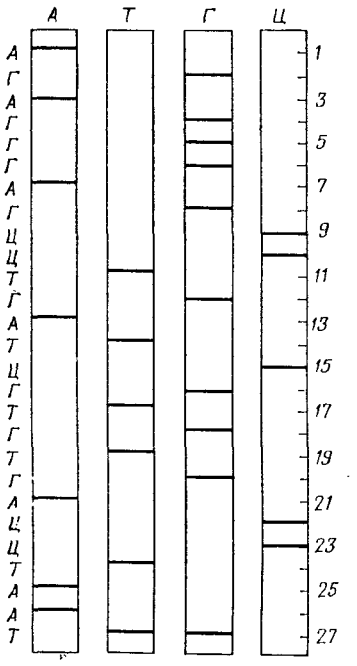


Рис. 8.7. Схема метода Максама — Гилберта

Получение гибридных плазмид, содержащих любые фрагменты ДНК, основывается на применении *рестриктаз* — ферментов, узнающих короткие последовательности ДНК и разрезающих молекулы ДНК в соответствующих местах. Гибридные плазмиды клонируют — размножают — вместе с бактериями, в которые они введены.

Такими методами были созданы культуры непатогенных бактерий *E. coli*, в которых синтезируются гормоны животных и человека — инсулин и другие, а также интерферон. Возможности генной инженерии чрезвычайно велики. Однако они не могли бы быть реализованы без прочтения текстов ДНК, без установления первичной структуры.

Мы уже упоминали о методе гель-электрофореза (с. 33). Молекулы ДНК, несущие отрицательные заряды на фосфатных группах, перемещаются в электрическом поле на разные расстояния в зависимости от своих размеров. С помощью рестриктаз ДНК делится на ряд фрагментов, которые разделяются посред-

ством гель-электрофореза. Установление последовательности нуклеотидов производится по *методу Максама и Гилберта* (1977), идея которого была предложена еще в 1972 г. Свердловым.

Допустим, что выделенный образец ДНК содержит тождественные однонитевые фрагменты. «Начала» этих фрагментов метят, пришивая к ним ^{32}P. Другой конец цепи не несет метки. Образец делят на четыре части. К первой из них добавляют вещество, рвущее нить вблизи аденина (А) с тем расчетом, чтобы в среднем в каждом фрагменте происходил один разрыв. Возникают уменьшенные субфрагменты разной длины, в том числе несущие метки ^{32}P. Таким же способом определяют субфрагменты разрывами цепи вблизи Т, Г и Ц. Полученные четыре образца разделяют параллельно методом гель-электрофореза. После этого на гель накладывается фотопластинка, на которой отпечатываются те полоски в геле, которые несут радиоактивную метку. Схематически полученный результат показан на рис. 8.7. Последовательность непосредственно читается по электрофореграмме. В одном опыте удается прочесть текст длиною до 500 нуклеотидов.

§ 8.4. Транспортные РНК

Транспортные РНК (тРНК) составляют около 10% общего количества РНК в клетке. Именно с тРНК началось исследование первичной структуры нуклеиновых кислот (Холли, Баев). Сейчас известны первичные структуры около 100 молекул тРНК различного происхождения. Имеется 20 семейств тРНК в соответствии с 20-ю аминокислотами.

Вторичная структура различных тРНК в принципе однотипна. Очевидно, что это должно быть так для выполнения молекулами тРНК их функции — узнавания кодона мРНК в рибосоме и включения аминокислоты в белковую цепь. Лишь инициирующая метиониновая тРНК имеет несколько иное строение.

Можно наглядно представить вторичную структуру тРНК, исходя из возможности спаривания комплементарных оснований А с У и Г с Ц и считая, что неспаривающиеся участки представляют собой петли (с. 230). Тогда все известные тРНК могут быть изображены схемой *«клеверного листа»* с четырьмя или пятью двуспиральными участками (рис. 8.8).

Четыре участка являются постоянными, пятый, обычно наименьший, меняется. «Клеверный лист» изображает проекцию на плоскость молекулы тРНК и передает лишь ее топологию, т. е. расположение двуспиральных участков.

Задача нахождения вторичной структуры РНК по последовательности нуклеотидов решалась Туманяном (1966). Алгоритм включает два этапа. Во-первых, строится треугольная матрица всех возможных пар по простому правилу: элемент a_{ij}, находящийся на пересечении i-го столбца и j-й строки, равен 1 или 0, если i-й и j-й нуклеотиды соответственно комплементарны или

некомплементарны. Для учета различия в свободных энергиях ГЦ- и АУ-пар вместо 1 ставятся соответствующие веса. Второй этап состоит в построении «максимальных шпилек», т. е. в нахождении вторичной структуры с одной двуспиральной областью, обладающей максимальной отрицательной свободной энергией.

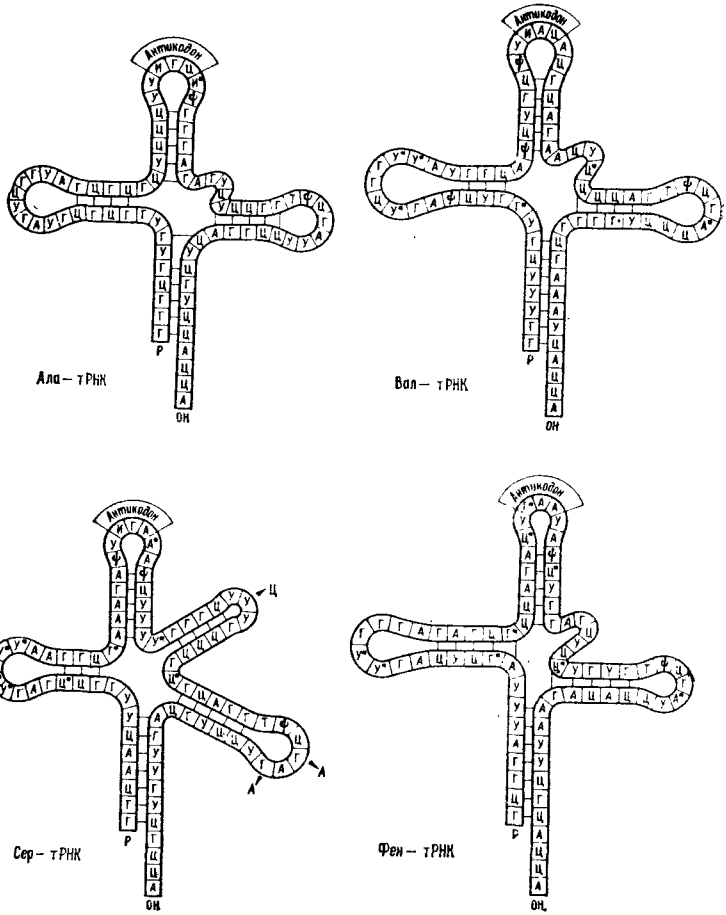


Рис. 8.8. Вторичные структуры некоторых тРНК (ψ, А*, У*, Г*, И — минорные нуклеотиды)

Затем производится уже довольно ограниченный перебор вторичных структур с разными числами найденных максимальных шпилек.

Позднее (1971) Тиноко провел уточнение значений свободных энергий образования пар и петель различного типа.

Что касается вторичной структуры тРНК, то, как показал Эйген, она может быть найдена с помощью игровой модели.

«Игра в тРНК или как делать клеверные листья» выглядит следующим образом. Каждому игроку дается случайная последовательность из N единиц, принадлежащих к четырем классам — А, У, Г, Ц, и тетраэдрическая кость, каждая грань которой соответствует одной из этих букв. Игроки бросают кость по очереди и, заполняя определенное место в последовательности выпавшей буквой, каждый игрок стремится получить двухцепочечную структуру с максимальным числом пар АУ и ГЦ. Игра окончена, когда один из игроков объявляет, что он получил «полную» структуру. Побеждает игрок, набравший к этому моменту максимальное число очков. Очки засчитываются за пары; можно, например, давать два очка за пару ГЦ и одно очко за АУ. Пары можно образовывать, лишь если имеется непрерывная последовательность 2 ГЦ или ГЦ, 2 АУ или 4 АУ (правило кооперативности). Для каждой петли в структуре должны оставаться неспаренными не менее 5 положений (ср. рис. 8.8). Игрок бросает кость для любого заранее им объявленного положения в последовательности. При $N = 80$ действительно всегда получается структура типа клеверного листа с 3—4 лепестками. Шпилька, имеющая только одну петлю, содержит максимальное число оснований, которые могут спариваться. Однако клеверный лист дает возможность испытать гораздо большее число комбинаций, так как отдельные лепестки можно сдвигать независимо и с самого начала возможно гораздо большее число комбинаций. «Природа, видимо, играет в эту игру с давних времен»,— пишет Эйген. Игра сходного типа может быть, по-видимому, разработана и при решении задачи о взаимосвязи первичной и пространственной структур белка (§ 4.6).

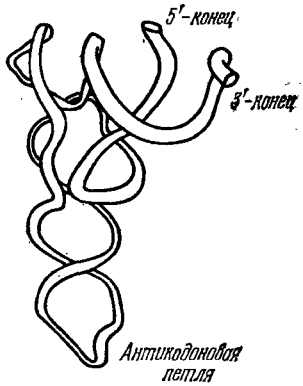


Рис. 8.9. Пространственная структура Фен-тРНК (Рич)

Пространственная структура нативной тРНК весьма компактна. Термически денатурированная тРНК способна к ренатурации. Рич (1972) расшифровал структуру Фен-тРНК методом рентгенографии. Эта рРНК построена из двух спиральных сегментов, соединенных под прямым углом, наподобие буквы Г. Структура показана на рис. 8.9. Компактная структура тРНК стабилизована горизонтальными и вертикальными взаимодействиями в двуспиральных участках, которые упаковываются под действием гидрофобных и электростатических сил. Ионы Mg^{++}, необходимые для поддержания нативной структуры, компенсируют отрицательные заряды фосфатных групп.

Спектр КД тРНК имеет интенсивные положительные максимумы при 264 нм ($\Delta\varepsilon \sim 5{,}5$) и при 188 нм ($\Delta\varepsilon \sim 18$), отри-

цательные максимумы при 296 нм ($\Delta\varepsilon = -0{,}35$), 233 нм ($\Delta\varepsilon = -1{,}0$), 210 нм ($\Delta\varepsilon \sim -5{,}0$). Полосы эти конформационно чувствительны.

Исследование миграции энергии между люминесцирующим основанием, находящимся в антикодоновой петле молекулы Фен — тРНК, и хромофорами (акридиновые красители), ковалентно присоединенными к акцепторному концу, позволило оценить расстояние между ними в согласии со структурными данными.

§ 8.5. Трансляция

Трансляция, перевод полинуклеотидного текста ДНК и мРНК в аминокислотный, белковый текст происходит в комплексах рибосом с полирибонуклеотидными цепями, т. е. в полисомах.

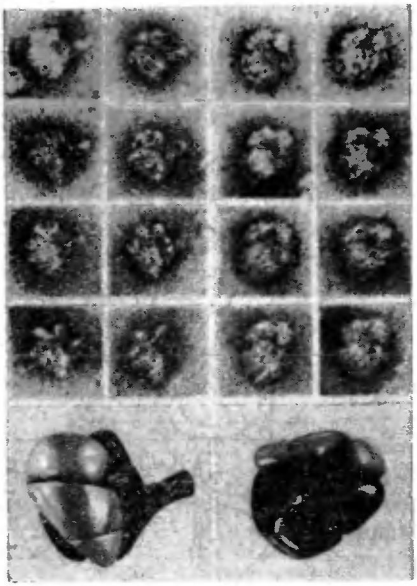


Рис. 8.10. Электронные микрофотографии прокариотических рибосом (увеличение 360 000) и соответствующая модель (Васильев)

Рибосомы наблюдаются с помощью электронного микроскопа (рис. 8.10) как округлые гранулы диаметром 15—25 нм. Характеристики рибосом приведены в табл. 8.2.

Рибосомы эукариот (клеток, содержащих ядра) характеризуются бóльшим значением $S^0_{20,w}$ (80 S, а не 70 S), м. м. $(4{,}1—4{,}7) \cdot 10^6$ и несколько бóльшими размерами (сухой объем $5 \cdot 10^3$ нм^3). 70 S-рибосомы состоят из двух субъединиц 30 S и 50 S, на которые они распадаются при уменьшении концентрации двухвалентных ионов (Mg^{2+}) или при увеличении концентрации одновалентных ионов. М. м. 50 S-частиц $1{,}8 \cdot 10^6$, 30 S-частиц $(0{,}7—1{,}0) \cdot 10^6$.

Рибосомальные РНК составляют примерно 65% сухого веса рибосом, белки — 35%. Эти РНК разделяются на 3 класса: 23—28 S, м. м. $\geqslant 1 \cdot 10^6$; 16—18 S, м. м. $< 1 \cdot 10^6$, и низкомолекулярные РНК — 5 S, м. м. $\sim 40\,000$. Вероятно, молекулы белка взаимодействуют с неспирализованными участками рРНК, рибонуклеопротеидный комплекс сворачивается в компактную структуру рибосомной субъединицы. В 70 S-рибосоме содержится примерно 65 полипептидных цепей со средней молекулярной массой 65 000. В 30 S-частицах имеется 19—20 сортов белков, в 50 S-частицах их более 50.

Полная «разборка» рибосом и их реконструкция из полученных белков и рРНК была осуществлена Номурой (1966—1969). Роль рРНК специфична, но не абсолютна — функциональные 30 S-частицы получаются из 16 S-рРНК одного вида бактерий и рибосомных 30 S-белков другого вида. Было выделено 19 бел-

Таблица 8.2. **Физические свойства рибосом *E. coli***

Константа седиментации $S^0_{20,w}$ (сведберги)	69,1—70,5
Характеристическая вязкость $[\eta]$, см³/г	6,1—6,8
Коэффициент поступательной диффузии $D^0_{20,w} \cdot 10^7$	1,83
Удельный объем, см³/г	0,64—0,60
Молекулярная масса	$\sim 3 \cdot 10^6$
Размеры в высушенном состоянии, нм	$\sim 20 \times 17 \times 17$
Объем, нм³	$\sim 3 \cdot 10^3$
Размеры в водной среде, нм	$\sim 30 \times 30 \times 20$
Объем, нм³	$\sim (3 \div 10) \cdot 10^3$
Количество удерживаемой воды, г/г	0,9

ков. Отсутствие любого из них сказывается на функции 30 S-частицы. Все белки действуют согласованно, что необходимо и для *самосборки*. Кинетика самосборки отвечает реакции первого порядка, что означает наличие медленной, лимитирующей процесс перестройки некоторой промежуточной системы. Сильная зависимость скорости самосборки от температуры показывает, что для этой перестройки требуется свободная энергия около 160 кДж/моль рибосом. Самосборка рибосом из всех компонент *in vitro* происходит примерно за 5 мин.

Электронно-микроскопические исследования дают богатую информацию о структуре рибосом (Васильев и др.). На рис. 8.10 показана одна из полученных картин. Оказалось, что имеется четыре типа рибосом — они разнятся у эубактерий, архебактерий, эукариот и у группы бактерий, зависимых от серы,— у эоцитов. На рис. 8.11 показаны соответствующие схемы строения. Эти особенности позволяют рассмотреть эволюцию рибосом.

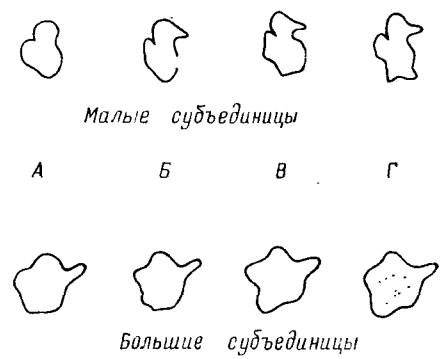


Рис. 8.11. Типы рибосом: *А* — эубактерия, *Б* — архебактерия, *В* — эоцит, *Г* — эукариот. Увеличение 250 000 (Лэйк)

Рибосома выполняет несколько задач: трансляцию, т. е. перевод генетической информации в мРНК на язык первичной структуры белка, изготовление белка и его секрецию. Рибосомы всех организмов подразделяются на две функциональные области — домен трансляции и домен секреции. Для работы рибосомы требуются так называемые факторы элонгации EF—Tu и

EF—G. В трансляционном домене содержатся центры связывания фактора инициации цепи, расположенные в щели малой субъединицы, центры связывания мРНК — также в малой субъединице, и, кроме того, пептидилтрансфераза и 5 S РНК, расположенные в большой субъединице, и белок, — способствующие транзиции, зависящей от ГТФ. В результате электронно-микроскопических исследований с использованием антител к синтезируемому белку не только установлена структура рибосом, но показано, что этот белок покидает рибосому в несвернутой, неглобулярной форме. Иначе быть не может, так как лишь при этих условиях рибосома работает как универсальная машина, секретирующая белок независимо от его структуры. Современная схема строения рибосомы показана на рис. 8.12. Рибосома прикрепляется к мембране эндоплазматического ретикулума. Для работы рибосом нужны двухвалентные ионы (Mg^{2+}). Каждая рибосома связывается лишь с одной полинуклеотидной цепью. В тройном комплексе рибосома — мРНК — аминоацил-тРНК последняя связывается своим антикодоном с кодоном мРНК.

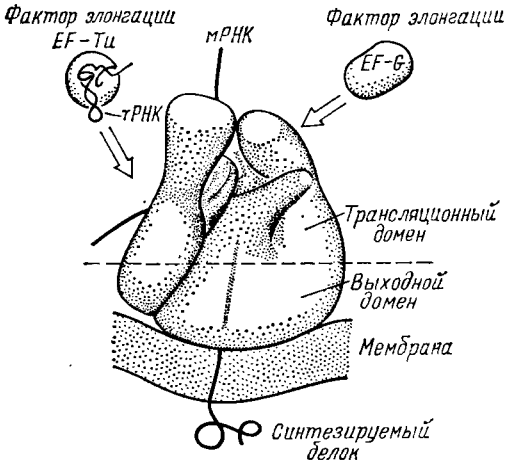
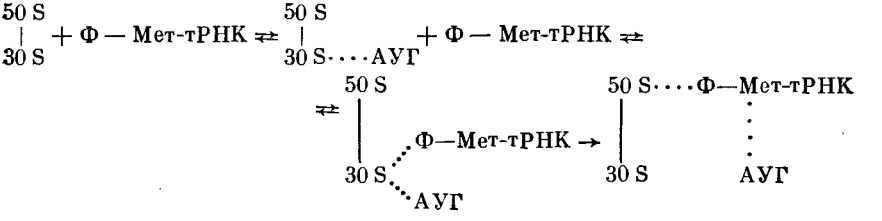


Рис. 8.12. Схема строения рибосомы (Лэйк)

Трансляция начинается с *инициации*, т. е. с синтеза первой пептидной связи. В инициацию вовлекаются одновременно два комплекса аминоацил-тРНК. Один из них является начальным. Установлено, что это всегда N-формилметионил-тРНК, обладающий повышенным сродством к пептидил-тРНК-связывающему участку рибосомы на 50 S-субъединице. Инициирующим кодоном мРНК служит АУГ, расположенный у *5′*-конца полинуклеотида (см. далее, с. 278). По-видимому, этот кодон предварительно связывается аминоацил-тРНК-связывающим участком 30 S-субъединицы. Общая схема инициации имеет вид (Ф — формил)



Далее происходит последовательная поликонденсация аминокислот. На протяжении всей трансляции растущий полипептид удерживается на рибосоме. Присоединение каждого следующего аминоацила идет на С-конце полипептида. Транспортная РНК, принесшая очередной аминоацил, остается с ним связанной. Этот аминоацил пристраивается путем замещения тРНК на комплекс аминоацил-тРНК. Получаем схему

Пептидил(n)-тРНК′ + + аминоацил-тРНК″ → → пептидил($n+1$)-тРНК″ + тРНК′.

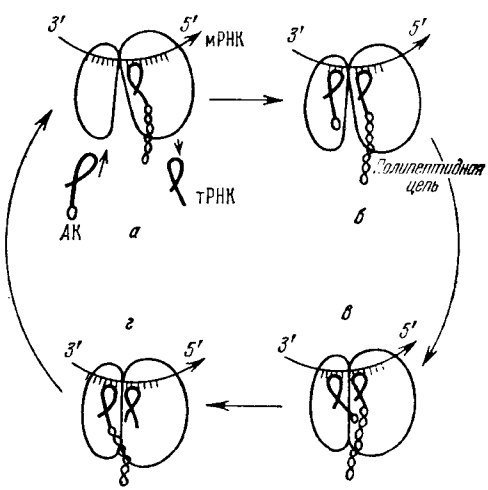


Рис. 8.13. Схема рабочего цикла рибосомы по Спирину

Этот процесс повторяется многократно в каждой рибосоме. Спирин предложил наглядную модель работы рибосомы (рис. 8.13). Предполагается, что аминоацил-тРНК - связывающий и пептидил-тРНК-связывающий участки локализуются на различных субъединицах, соответственно на 30 S и 50 S (рис. 8.13, *б*). На 50 S-частице находится пептидилтрансферазный центр, обеспечивающий перенос пептидила. Происходит периодическое размыкание и смыкание рибосомы. На рис. 8.13, *в* рибосома сомкнута, аминоацильный конец комплекса аминоацил-тРНК располагается вплотную к этерифицированному карбоксилу пептидила. Смыкание субъединиц рибосомы (*б* → *в*) сопровождается образованием пептидной связи. Карбоксил переносится на аминогруппу комплекса аминоацил-тРНК и на 50 S-частице остается деацилированная тРНК (рис. 8.13, *г*). Затем происходит транслокация — тРНК переходит от пептидил-тРНК с 30 S- на 50 S-частицу, увлекая за собой связанный с ней кодон мРНК и вытесняя деацилированную тРНК из пептидил-тРНК-связывающего участка. Рибосома вновь размыкается (рис. 8.13, *а*). Затем на расположенный в 30 S-частице новый кодон поступает новый комплекс аминоацил-тРНК и цикл начинается сначала. Периодическое размыкание и смыкание рибосомы есть, по Спирину, приводной механизм, обеспечивающий пространственные перемещения тРНК и мРНК в процессе трансляции. Периодическое изменение четвертичной структуры рибосомы преобразуется в поступательное движение цепи мРНК. Это механохимический процесс — механическая работа совершается за счет энергии, выделяемой при связывании слабыми силами и за счет химической энергии ГТФ.

Смыкание рибосомы индуцируется поступлением в рибосому аминоацил-тРНК, размыкание требует энергии ГТФ. Гаврилова и Спирин показали, однако, что рибосома может работать *in vitro* и без ГТФ. По-видимому, способность к такой *неэнзиматической трансляции* заложена в самой структурной организации рибосомы.

Количественная физическая теория всех этих событий пока не построена. Экспериментально показано, что трансляция зависит от конформации мРНК и что активный рибосомный комплекс действительно испытывает при трансляции периодические конформационные изменения.

Как уже говорилось, одна цепь мРНК сочетается с рядом рибосом, образуя полисому. Размеры полисом зависят от длины цепей мРНК. Одна рибосома приходится примерно на 80—90 нуклеотидов цепи. При синтезе белков, содержащих примерно 150 аминокислотных остатков, в полисоме имеется 4—6 рибосом, при синтезе более длинных белковых цепей — 12—20 и более рибосом. Одна цепь мРНК обеспечивает, таким образом, синтез ряда белковых цепей. Матричная РНК в дальнейшем деградирует под действием фермента *экзонуклеазы*, еще недостаточно изученного. Рибосома, присоединяясь к 5′-концу мРНК, защищает его от деградации. При перемещении рибосомы 5′-конечный участок либо деградирует, либо присоединяет новую рибосому. Деградировавший конец уже не может присоединять рибосому, но ранее присоединенные рибосомы продолжают двигаться, синтезируя белковые цепи. Время, необходимое для синтеза цепи, содержащей 400 остатков, составляет примерно 30 с. Время τ прохождения рибосомой среднего расстояния δ между двумя рибосомами в полисоме составляет около 3 с, что отвечает линейной скорости порядка 10^{-6} м/с.

Математическая модель, описывающая эти процессы, позволяет вычислить распределение размеров мРНК в согласии с опытом.

В целом биосинтез белка определяется скоростями транскрипции и трансляции. По-видимому, эти скорости соизмеримы, так как при мечении мРНК радиоактивными атомами наблюдается корреляция между длинами меченых мРНК и полисом и свободные меченые мРНК отсутствуют.

§ 8.6. Расшифровка генетического кода и его смысл

Прямой путь к решению проблемы был проложен Ниренбергом и Маттеи (1961). При введении синтетических полирибонуклеотидов в бесклеточную систему аминокислоты включаются в полипептидную цепь. Бесклеточная система содержала рибосомы, набор тРНК, АТФ, все необходимые ферменты, но не содержала ДНК и мРНК. Система приготовлялась из разрушенных клеток *E. coli*. Центрифугированием выделялись рибосомная и надосадочная фракции. Рибосомы отмывались, надосадочная

жидкость, содержащая ферменты и тРНК, диализовалась против специального буфера. К смеси этих двух очищенных фракций добавлялась система, генерирующая АТФ — источник энергии. В бесклеточную систему вводились синтетические полирибонуклеотиды и изучалось включение меченных ^{14}C аминокислот во фракцию, нерастворимую в трихлоруксусной кислоте, т. е. в полипептиды. Оказалось возможным «обмануть» биологическую систему — вместо природной мРНК рибосомы взаимодействовали

Таблица 8.3. **Кодирующие триплеты, полученные на основании опытов с поли-АУ (1 : 5)**

Аминокислотный остаток	Вычисленные доли триплетов				Сумма долей	Включение аминокислоты
	3А	2А1У	1А2У	3У		
Асн	—	4	—	—	4	6,6
Иле	—	4	20	—	24	20
Лей	—	—	20	—	20	15
Лиз	0,8	4	—	—	4,8	3,1
Тир	—	—	20	—	20	25
Фен	—	—	—	100	100	100

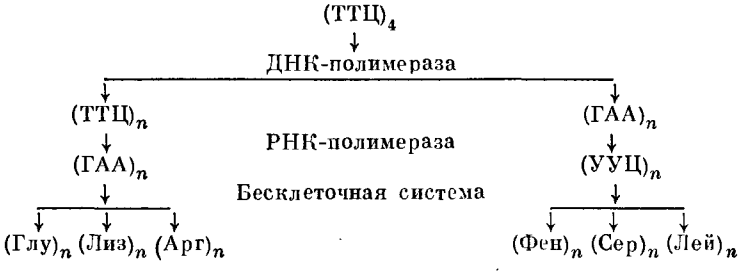
с синтетическим полирибонуклеотидом. Оказалось, что цепь поли-У стимулирует поликонденсацию фенилаланина, а поли-Ц — пролина.

Так были установлены первые кодоны. Если код триплетен, то Фен отвечает кодон УУУ, а Про — кодон ЦЦЦ. Далее изучалось действие сополимеров известного состава, но со случайной последовательностью нуклеотидов. В таком сополимере известна частота появления триплетов определенного состава. Сополимер АУ в пропорции 1 : 5 стимулирует включение в полипептидную цепь Фен, Лей, Иле и в меньших количествах Асн и Лиз. Если 100 — доля триплета 3У, то доля 1А2У — 20 (3У/1А2У = 5), доля 2А1У — 4 (3У/2А1У = 25) и 3А — 0,8 (3У/3А = 125). Сравнивая эти значения со степенями включения (для Фен она принимается равной 100), можно установить состав кодонов для названных аминокислотных остатков (табл. 8.3).

Так были установлены триплеты 3У для Фен, 1А2У для Тир, 2А1У и 1А2У для Иле, 1А2У для Лей, 2А1У для Асн и 3А и 2А1У для Лиз. В дальнейшем последний триплет оказался не кодирующим Лиз, остальные подтвердились.

Однако такие опыты еще не дают полной расшифровки кода. Остается неизвестным, какой из трех кодонов АУУ, УАУ или УУА кодирует Тир и т. п. В последующих опытах Ниренберг применил уже не полинуклеотиды, а тринуклеотиды известного строения. В системах образуются комплексы тринуклеотид — тРНК — аминокислота (аминоацил). Синтез полипептида при этом не идет, но, поскольку тринуклеотид имитирует кодон, образование комплекса позволяет его прочесть. Для этого нужно изучить все тРНК, которые последовательно связываются с ме-

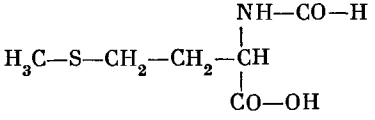
ченными аминокислотами. Так были исследованы все 64 триплета и установлено, с какими аминокислотами они связаны. Окончательную расшифровку, подтвердившую эти результаты, провел Корана (1966). Он синтезировал олигодезоксирибонуклеотиды, представлявшие собой повторяющиеся триплеты известного строения (например, $(ТТЦ)_4$). Далее такой олигомер применялся в качестве матрицы для синтеза *in vitro* ДНК-подобного полимера в системе, содержавшей нуклеозидтрифосфаты Т, Ц, Г, А, ДНК-полимеразу и нужные ионы (ср. с. 249). При этом синтезировалась ДНК-подобная двойная спираль. Обе цепи спирали содержали комплементарные, повторяющиеся n раз триплеты. Затем каждая из цепей служила матрицей для транскрипции — для синтеза полирибонуклеотида с помощью РНК-полимеразы. Таким образом, Корана получил две цепи, имитирующие мРНК с известной последовательностью повторяющихся триплетов. Обе цепи вводились в бесклеточную систему и определялось включение аминокислоты в полипептидную фракцию по методу Ниренберга. Эти красивые опыты позволили проверить шесть кодонов в одном многостадийном синтезе в соответствии со схемой



Полимер $(ГАА)_n$ содержит кодоны ГАА, ААГ и АГА, а полимер $(УУЦ)_n$ — кодоны УУЦ, УЦУ и ЦУУ. Так как функциональность гомополимеров $(ААА)_n$, $(ЦЦЦ)_n$, $(ГГГ)_n$ и $(УУУ)_n$ уже определена, для проверки остальных 60 кодонов нужно провести 10 таких многостадийных опытов.

Установленный этими методами генетический код показан на рис. 8.14. Каждый кодон РНК обозначен как *xyz*.

Кодоны ГУГ (Вал) и АУГ (Мет) кодируют указанные аминокислотные остатки в середине белковой цепи. Вместе с тем они служат инициаторами синтеза цепи, кодируя на ее N-конце формилметионин



Если искусственная матрица этих кодонов не содержит, то синтезируются цепи, начинающиеся с произвольного звена и имеющие поэтому различные N-концы. Напротив, при наличии

ГУГ или АУГ образуются стандартные Ф-Мет-концы. Однако в природных белках Ф-Мет не содержится. В бесклеточной системе *E. coli* образуются цепи с N-концами Ф-Мет-Ала, Ф-Мет-Сер, но не Ф-Мет-Мет. Естественные белки *E. coli* имеют обычно

x \ y	А	Ц	Г	У	z
А	Лиз Асн Лиз Асн	Тре	Арг Сер Арг Сер	Иле Иле Мет Иле	А Ц Г У
Ц	Глн Гис Глн Гис	Про	Арг	Лей	А Ц Г У
Г	Глу Асп Глу Асп	Ала	Гли	Вал	А Ц Г У
У	— Тир — Тир	Сер	— Цис Трп Цис	Лей Фен Лей Фен	А Ц Г У

Рис. 8.14. Таблица генетического кода

на N-концах Мет, Ала, Сер. Можно думать, что в живых системах действуют два фермента — один из них отщепляет Ф-Мет от цепи, другой — формильную группу от Мет.

Кодоны УАА, УАГ, УГА — терминальные. Они ответственны за обрыв белковой цепи и никаких аминокислотных остатков не кодируют.

Генетический код универсален. Одинаковые кодоны действуют аналогичным образом в различных организмах. Универсальность кода непосредственно доказывается размножением фагов и вирусов в клетках. Вирусная ДНК или РНК использует биосинтетический аппарат клетки и синтезирует свои белки. В то же время установлено, что поли-У стимулирует включение Фен в бесклеточных системах, приготовленных как из клеток млекопитающих, так и водорослей. То же относится и к другим синтетическим полинуклеотидам. Тринуклеотидная техника Ниренберга была применена к бесклеточным системам, полученным из клеток лягушки *Xenopus laevis* и морской свинки, и привела к одинаковым результатам.

Отклонения от универсальности кода, как об этом уже говорилось на с. 262, наблюдаются в митохондриях. У митохондрий человека АУА кодирует не Иле, а Мет, кодон УГА — не обрыв цепи, а Трп, кодоны АГА и АГГ — терминирующие. Кодовая таблица оказывается более симметричной в соответствии с предсказанием Ичаса (1969). У митохондрий дрожжей УГА — Трп; ЦУА, ЦУЦ, ЦУГ, ЦУУ — не Лей, а Тре, АГА, АГТ — терминирующие. Вырождение для Тре достигло восьми кодонов.

Расшифровка генетического кода — крупнейшее достижение молекулярной биологии, биохимии и биофизики. От постановки задачи до ее полного решения прошло немногим более 10 лет — срок очень малый.

Установление кода выдвинуло новые проблемы. Имеет ли генетический код физический, молекулярный смысл или корреляция между кодонами и аминокислотами случайна? Что можно сказать в этой связи о происхождении и эволюции кода? Как связаны точечные мутации с особенностями кодовой таблицы? Какие факторы влияют на чтение кода, на процессы транскрипции и трансляции? Ответы — далеко не полные — на эти вопросы содержатся в дальнейшем изложении. Здесь мы остановимся на физическом смысле кода.

Прежде всего следует обратить внимание на характер вырождения кодонов (рис. 8.14). Для 32-х, т. е. для половины всех кодонов, имеется полное вырождение по третьему нуклеотиду z. Иными словами, аминокислота полностью задана двумя первыми нуклеотидами x и y и не зависит от нуклеотида z. Для двукратно вырожденных кодонов характер аминокислоты различен для $z =$ А, Г (пурин) и для $z =$ Ц, У (пиримидин).

Шестнадцать дублетов xy можно сгруппировать по восемь так, чтобы в первом октете содержались дублеты xy, кодирующие аминокислотный остаток независимо от z, а во втором октете — остальные дублеты (Румер). Это показано в табл. 8.4.

Таблица 8.4. **Система кодонов**

Первый октет				Второй октет				
			Остаток				Остаток	Остаток
x	y	n	(z= =А, Г, У, Ц)	x	y	n	(z=А, Г)	(z=У, Ц)
Г	Г	6	Гли	Г	А	5	Глу	Асп
Г	Ц	6	Ала	А	Г	5	Арг	Сер
Ц	Г	6	Арг	У	Г	5	Терм (z = А) Трп (z = Г)	Цис
Ц	Ц	6	Про	Ц	А	5	Глн	Гис
Ц	У	5	Лей	А	А	4	Лиз	Асн
Г	У	5	Вал	А	У	4	Иле (z = А) Мет (z = Г)	Иле
А	Ц	5	Тре	У	А	4	Терм	Тир
У	Ц	5	Сер	У	У	4	Лей	Фен

В столбцах n указаны числа водородных связей между нуклеотидами xy кодона и комплементарными им нуклеотидами $x'y'$ антикодона. Дублеты xy первого и второго октетов резко различаются по составу. В первом октете А встречается лишь один раз, во втором — один раз — Ц. В первом октете и для x, и для y $(Г + Ц)/(А + У) = 3$, во втором — $(Г + Ц)/(А + У) = 1/3$. Значение n, которое можно назвать степенью комплементарности,

в первом октете 6 и 5 ($\bar{n}=5{,}5$), во втором — 5 и 4 ($\bar{n}=4{,}5$). Можно думать, что чем выше n, тем меньшее значение имеет взаимодействие $z-z'$-кодона с антикодоном, так как связь $xy-x'y'$ достаточно прочна.

Вырождение по z в первом октете связано с так называемыми «*виляниями*» (wobbles) взаимодействия $z-z'$ (Крик). Это взаимодействие, в отличие от $xy-x'y'$, неоднозначно, как о том свидетельствует табл. 8.5.

Таблица 8.5. **Узнавание пар третьим нуклеотидом антикодона**

z'	А	У	Г	Ц	И
z	А	А, Г	Ц, У	Г	А, Ц, У

И — минорный нуклеотид инозин.

Генетически кодируется первичная структура белка, а биологически функционально — пространственное строение глобулы. Мутационные замещения нуклеотидов матрицы по-разному сказываются на функциональности белка. Мы видели, что гидрофобность аминокислотного остатка имеет важнейшее значение для структуры глобулы (см. § 4.5). Соответственно мутации, сильно изменяющие гидрофобность остатка, должны сильнее сказываться на биологических свойствах белка, чем мутации, мало меняющие гидрофобность. Первый тип мутаций более опасен для существования особи и вида, чем второй. Можно думать, что эволюция, приведшая к современному коду, шла в направлении возрастающей его *надежности* в смысле уменьшения доли более опасных мутаций. Убедимся в надежности кода.

Рассмотрим табл. 4.5 (с. 108), в которой приведены гидрофобности аминокислот. Средняя разность этих значений при произвольном замещении одной аминокислоты на другую равна 5370 Дж/моль. В пределах условно введенных первого и второго классов аминокислот — гидрофобных (первые 10) и гидрофильных (вторые 10 аминокислот) — средние разности равны 3370 и 1640 Дж/моль соответственно.

Класс аминокислоты в первую очередь зависит от второго нуклеотида y в кодоне xyz. При $y=$ У остаток всегда гидрофобен (Иле, Мет, Лей, Вал, Фен). Назовем мутации, не меняющие класса остатка, правильными, меняющие класс — неправильными. Вторые более опасны для структуры белка. При замене одного из нуклеотидов в кодоне xyz получается следующее распределение правильных и неправильных мутаций:

	120 правильных	74 правильных	156 правильных
Замена	x	y	z
	54 неправильных	102 неправильных	20 неправильных.

Всего 350 (66,5%) правильных замен и 176 (33,5%) неправильных. К правильным заменам относятся и «*тихие мутации*», т. е. те случаи, в которых замена нуклеотида не сопровождается заменой остатка вследствие вырождения кода. Код устроен так, что вероятность правильной мутации вдвое больше неправильной.

Вычислим средние разности гидрофобностей остатков, отвечающие однократным замещениям нуклеотидов. Получаем

при замене x 4200, y 5370, z 1420 Дж/моль

и в среднем по всем трем нуклеотидам 3660 Дж/моль, что заметно меньше значения 5370 Дж/моль при случайном замещении аминокислот. Опыт дает среднюю разность гидрофобностей исходной и замещающей аминокислот для 70 мутантов гемоглобина человека 3500, для 6 цитохромов c — 3780 Дж/моль и т. д. Анализ 423 замещений при сопоставлении шести гомологичных белков различных видов (цитохром c, гемоглобины α и β, инсулины A и B) дает среднюю разность гидрофобностей 3240 Дж/моль.

Таким образом, код обладает высокой, хотя и не абсолютной, надежностью по отношению к правильным мутациям, обеспечивая их бóльшую вероятность. Преимущество правильных мутаций определяется пространственным строением белка в водном окружении и, тем самым, особыми физическими свойствами воды. Корреляция кодонов с аминокислотами оказывается продиктованной физикой воды.

§ 8.7. Мутации

Мутации происходят либо спонтанно, либо под влиянием мощных внешних факторов — химических или радиационных воздействий на хромосомы и гены. Следует различать *хромосомные мутации* — перестройки хромосом, наблюдаемые под микроскопом, и *точечные*, или генные, *мутации*. Первые представляют собой изменения надмолекулярных структур, вторые — изменения последовательности нуклеотидов в ДНК и, соответственно, в мРНК. Здесь мы остановимся на точечных мутациях.

Существуют четыре типа точечных мутаций.

а) Мутации, состоящие в заменах нуклеотидов в кодонах, меняющие смысл кодона, т. е. кодируемый аминокислотный остаток в белке (missense mutations).

б) Такие же замены, переводящие кодон в совместно с ним вырожденный, т. е. не меняющие аминокислотный остаток в белке. Эти «тихие мутации» (silent mutations) фенотипически не проявляются, но имеют весьма важное значение для эволюции (см. далее, § 17.9).

в) Мутации, превращающие осмысленный кодон в *терминальный* УАА, УАГ, УГА (nonsense mutations). Эти мутации, приводящие к обрыву белковой цепи, особенно опасны.

г) Делеции нуклеотидов или их включения, т. е. мутации сдвига рамки (frame shift mutations, см. с. 260).

Спонтанные генные мутации определяются ошибками при репликации ДНК, возникающими вследствие теплового движения атомов и молекул. Очевидно, что ошибки транскрипции и трансляции не наследуются.

Включение нуклеотида, некомплементарного матричному, делеция или замена нуклеотида обычно приводят к образованию петли в двойной спирали ДНК (см. с. 230). В последующих репликациях ДНК петля исчезает вследствие полуконсервативного синтеза, но первичная структура ДНК остается измененной. Наряду с образованием петель возможно образование пары, отличной от уотсон-криковской вследствие способности азотистого основания создавать необычные водородные связи (с. 231), а также вследствие таутомерии (с. 37).

Очевидно, что замена пары АТ на ГЦ термодинамически выгодна, так как Г связывается с Ц сильнее, чем А с Т. Если бы все сводилось к термодинамике, то в ходе эволюции должно было бы увеличиваться относительное содержание ГЦ в ДНК. Это не так — у высших организмов содержание ГЦ стабилизовано на уровне 40—45%. Эволюционное образование «Г + Ц-организма» биологически бессмысленно, так как триплеты, не содержащие А и Т (А и У в мРНК), кодируют только Про, Арг, Ала и Гли, т. е. лишь $^1/_5$ всех аминокислотных остатков.

Различные точечные мутации имеют различные вероятности. Фогель и Копун (1977) проанализировали 1293 замещения аминокислотных остатков в филогенетически связанных белках, объясняемые однократными замещениями нуклеотидов xy в кодонах xyz. Замещения z не рассматриваются, так как из $61 \cdot 3 = 183$ замещений в осмысленных кодонах 7 ведут к терминальным кодонам и 126 представляют собой тихие мутации. Найденные таким образом числа n_i замещений $x \to x'$ и $y \to y'$ в кодонах РНК приведены в табл. 8.6.

Таблица 8.6. Числа мутационных замещений $x \to x'$ и $y \to y'$ в кодонах РНК для филогенетически связанных белков

x, y \ x', y'	А	Г	Ц	У
А	—	237	114	60
Г	272	—	92	71
Ц	96	73	—	92
У	54	63	69	—

Для того чтобы найти относительные вероятности таких мутаций, следует учесть некоторые различия между числами нуклеотидных замещений m_i, которые могут наблюдаться в виде

замещений аминокислотных остатков, согласно коду. Получаем табл. 8.7. Относительные вероятности замещений находятся по формуле

$$p_i = \frac{n_i}{\sum\limits_i n_i} \frac{\sum\limits_i m_i}{m_i}. \qquad (8.1)$$

Нормируя p_i к 1, получаем табл. 8.8.

Замены нуклеотидов являются *транзициями* или *трансверсиями*. Транзиции — замещения пурина на пурин и пиримидина на пиримидин А ⇄ Г, Ц ⇄ У, трансверсии — замещения пурина

Таблица 8.7. **Числа принципиально наблюдаемых замещений m_i $x \to x'$ и $y \to y'$ в кодонах**

x, y \ x', y'	А	Г	Ц	У
А	—	30	28	27
Г	30	—	31	28
Ц	28	31	—	27
У	27	28	27	—

на пиримидин и наоборот А ⇄ Ц, А ⇄ У, Г ⇄ Ц, Г ⇄ У. Согласно табл. 8.8 вероятность транзиций $p = 0{,}68$, трансверсий $1 - p = 0{,}32$. Данные, относящиеся к 198 мутантам гемоглобина человека, дают несколько иные значения: $p = 0{,}62$, $1 - p = 0{,}38$.

Эти данные характеризуют два обстоятельства: истинные вероятности замещений нуклеотидов в ДНК и РНК и выжива-

Таблица 8.8. **Нормированные относительные вероятности замещений $x \to x'$, $y \to y'$ в кодонах РНК по данным для белков**

x, y \ x', y'	А	Г	Ц	У
А	—	0,177	0,091	0,050
Г	0,201	—	0,067	0,057
Ц	0,076	0,053	—	0,076
У	0,045	0,051	0,057	—

ние соответствующих мутантных белков. В последнее время были получены данные, относящиеся непосредственно к РНК,— 247 замещений. Соответствующие нормированные относительные вероятности представлены в табл. 8.9. Превышение вероятностей транзиций над вероятностями трансверсий сохраняется, но оказывается не столь значительным: $p = 0{,}56$, $1 - p = 0{,}44$.

Имеется существенное различие в вероятностях замещений, найденных из первичных структур белков (табл. 8.8) и непосредственно из первичных структур РНК (табл. 8.9). В первом случае вероятности транзиций А $\rightleftarrows$ Г существенно превосходят вероятности трансверсий и транзиций Ц $\rightleftarrows$ У, во втором случае этого нет. Следовательно, замещения А $\rightleftarrows$ Г дают меньшую долю

Таблица 8.9. **Нормированные относительные вероятности замещений в РНК**

x, y \ x', y'	А	Г	Ц	У
А	—	0,065	0,040	0,053
Г	0,117	—	0,109	0,121
Ц	0,093	0,113	—	0,121
У	0,049	0,028	0,089	—

леталей, чем другие замещения. Это объясняется тем, что аминокислотные остатки, связанные переходами А $\rightleftarrows$ Г, существенно ближе друг другу, чем связанные другими переходами. В самом деле, переходам А $\rightleftarrows$ Г отвечают наименьшие изменения гидрофобностей. Напротив, переходам Ц $\rightleftarrows$ У отвечают вдвое большие изменения. В табл. 8.10 приведены усредненные изменения гидрофобностей аминокислотных остатков при замещениях нуклеотидов в мРНК.

Таблица 8.10. **Средние разности гидрофобностей аминокислотных остатков (в кДж/моль) при замещениях $x \to x'$, $y \to y'$ в кодонах мРНК**

x, y \ x', y'	А	Г	Ц	У
А	—	2,94	4,97	5,10
Г	2,94	—	4,35	6,24
Ц	4,97	4,35	—	5,69
У	5,10	6,24	5,68	—

Таким образом, мутации А $\rightleftarrows$ Г наименее опасны для структуры и функции белка и им должен отвечать наименьший процент леталей. Истинные вероятности замещений характеризуются табл. 8.9. Они согласуются с квантовомеханическими расчетами энергий взаимодействия в разных парах азотистых оснований.

Мы рассмотрели мутации класса а (с. 282), приводящие к замене аминокислотного остатка. Обратимся к мутациям класса б, приводящим к обрыву белковой цепи. Таких мутаций, определяемых единичными замещениями нуклеотидов в кодонах xyz, всего 23—9 замещений в x, 7 — в y и 7 — в z. Из 23 му-

таций 18 являются трансверсиями и лишь 5 — транзициями. Меньшая вероятность трансверсий до некоторой степени снижает вероятность гибельной терминальной мутации.

Значения вероятностей точечных замещений в кодонах, приведенные в табл. 8.9, позволяют вычислить относительные вероятности терминальных мутаций. Эти значения приведены в табл. 8.11.

Таким образом, наиболее вероятны терминальные мутации в кодоне УГГ, кодирующем Трп. Из 9 мутаций этого кодона 2

Таблица 8.11. **Относительные вероятности мутаций, ведущих к терминальным кодонам УАА, УАГ, УГА**

У → А в кодонах УУГ, УГУ	0,049
А → У в кодонах ААА, ААГ, АГА	0,053
У → Г + У → А в кодонах УУА, УАУ	0,077
Ц → А в кодонах УЦГ, УГЦ	0,093
Г → У в кодонах ГАА, ГАГ, ГГА	0,121
Ц → У в кодонах ЦАА, ЦАГ, ЦГА	0,121
Ц → Г + Ц → А в кодонах УЦА, УАЦ	0,206
2 мутации Г → А в кодонах УГГ	0,234

являются терминальными, происходящими с повышенной вероятностью. Можно думать, что с этим обстоятельством связано то, что в гене, кодирующем Трп-тРНК, зачастую происходят мутации, превращающие эту тРНК в супрессорную. Сохранность кодона УГГ особенно существенна.

Что касается «тихих» мутаций класса б, то они играют существенную роль в эволюции. Кодирование одной и той же аминокислоты разными кодонами оказывается свойственным не только разным организмам, но и разным клеткам одного и того же организма. Это определяется, по-видимому, различиями в количествах соответствующих тРНК. Тем самым такие мутации имеют регуляторное значение. Совместно вырожденные кодоны могут мутировать по-разному. Так, например, мутация УУГ (Лей) → УУА (Лей) не меняет остатка. Но вероятность терминальной мутации УУА равна 0,077, а для УУГ равна 0,049 (табл. 8.11).

В то же время, по-видимому, кодоны не независимы друг от друга — мутации в соседних кодонах влияют на поведение данного кодона при биосинтезе белка. Вопросы эти еще недостаточно исследованы.

Мы рассмотрели точечные мутации структурных генов. Для онтогенеза и эволюции не менее, если не более существенны мутации регуляторных генов.

§ 8.8. Регуляция генов

Функционирование генов, т. е. биосинтез белка, подвергается тонкой регуляции в живых системах. За регуляцию на молекулярном уровне ответственны явления молекулярного узнавания, реализуемые посредством слабых взаимодействий. В конечном счете именно молекулярные взаимодействия, формирующие необходимые для регуляторных процессов обратные связи, определяют весь путь биологического развития клетки. Мы уже встречались с обратными связями на молекулярном уровне — с явлением аллостеризма (с. 203).

Синтез белка искажается при воздействии мутагенных факторов на ДНК. Немутагенные вещества также могут существенно влиять на работу генов. У прокариот было открыто явление *индуцированного синтеза ферментов*. Клетки *E. coli* дикого типа, растущие в среде с негалактозидным источником углерода, почти не синтезируют фермент *β-галактозидазу*, катализирующий гидролиз галактозида — лактозы. Добавление вещества, служащего индуктором синтеза, например, метилтиогалактозида, к растущей культуре *E. coli* дикого типа увеличивает скорость синтеза галактозидазы в 10^3 раз. Дикий тип *E. coli* представляет собой *индуцируемый тип*. В то же время имеются мутантные штаммы *E. coli*, синтезирующие β-галактозидазу и без индуктора. Такие мутанты называются *конститутивными*. Индуктор воздействует на генетическую систему клетки. Жакоб и Моно (1961) провели генетический анализ индуцированного синтеза, исходя из простой гипотезы, получившей в дальнейшем веские подтверждения.

Индуцированный синтез подавляется специфическим веществом — *репрессором*, находящимся в цитоплазме. Репрессор синтезируется особым *геном-регулятором*. Позднее было показано, что репрессоры — белки. Репрессор действует на *ген-оператор*, управляющий переносом информации от нескольких структурных генов к синтезируемым белкам. При воздействии репрессора прекращается работа всей совокупности этих генов — всего *оперона*.

Индуктор синтеза взаимодействует с белком-репрессором и выключает его влияние на ген-оператор.

На рис. 8.15 показана схема описанной генетической системы. В рассматриваемом примере репрессор контролирует синтез по крайней мере двух ферментов: β-галактозидазы и β-галактозидпермеазы. Второй фермент определяет скорость поступления β-галактозидов в бактериальные клетки сквозь мембраны. Синтез двух ферментов необходимым образом коррелирован.

Модель оперона полностью подтверждена генетическими исследованиями, доказавшими существование гена-регулятора, гена-оператора и их мутаций. Синтез β-галактозидазы в *E. coli* контролируется так называемым *Лак-опероном*. На него действует *Лак-репрессор* — тетрамерный белок с м. м. 150 000.

Известны системы, в которых один специфический репрессор воздействует на несколько разных оперонов.

И в регуляции оперона, и в процессах редупликации ДНК и транскрипции, катализируемых соответствующими полимеразами, мы встречаемся с важнейшими для биологии и биофизики

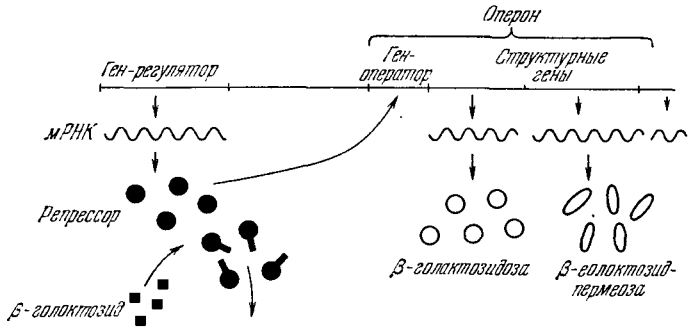


Рис. 8.15. Схема оперона

процессами белково-нуклеинового узнавания. Реализуется «*гиперцикл*» (Эйген, см. § 17.4): ДНК и мРНК ответственны за синтез белка, который в свою очередь определяет функционирование нуклеиновой кислоты.

Гурский, Готтих и соавторы предложили код белково-нуклеинового узнавания, определяющий регуляцию транскрипции (1976). Предполагается, что участок регуляторного белка состоит из двух антипараллельных сегментов полипептидной цепи, образующих β-структуру. Узнавание основано на комплементарности этой структуры и последовательности нуклеотидных пар ДНК. Важное свойство такой последовательности состоит в асимметричном распределении гуанинов между двумя нитями ДНК. В предлагаемом коде шесть аминокислотных остатков — Сер, Тре, Асп, Гис, Глн, Цис — и их последовательность в стереоспецифичном участке белка определяет последовательность пар оснований ДНК, с которой данный белок преимущественно связывается. Код, разработанный на основе стереохимии, подтвержден взаимодействием Лак-репрессора с Лак-опероном и другими примерами.

Контроль гена-оператора над опероном, по-видимому, определяется тем, что синтез мРНК начинается с конца оперона, примыкающего к гену-оператору.

Описанный способ контроля и регуляции биосинтеза белка у прокариот еще не может обеспечить регуляторные нужды клетки. Белки, кодируемые одним и тем же опероном, могут требоваться в разных количествах и в разное время. Для понимания соответствующих регуляторных явлений необходимо детальное рассмотрение процесса транскрипции. Рационально рассматривать начало синтеза РНК на ДНК (инициацию) и про-

должение этого синтеза (элонгацию) как две самостоятельные стадии.

ДНК-зависимый синтез РНК подавляется рядом антибиотиков, таких как актиномицин, которые блокируют матрицу ДНК. Антибиотики группы рифамицина, напротив, действуют на РНК-полимеразу. Рифамицин действует на стадии инициации, препятствуя образованию первой межнуклеотидной связи. Другие вещества, влияющие на полимеразу, ингибируют элонгацию.

Регуляция транскрипции далеко не всегда реализуется по схеме Жакоба и Моно посредством негативного регуляторного фактора-репрессора. В случае фаговых ДНК считывание определенных генов не происходит и в отсутствие каких-либо репрессоров. Для включения этих генов необходимы позитивные регуляторные факторы.

При заражении клетки *E. coli* Т-четными фагами реализуется четко отрегулированная временна́я последовательность процессов транскрипции. Через несколько минут после заражения происходит выключение синтеза мРНК и белков клетки-хозяина и синтезируется несколько новых ферментов, необходимых для синтеза фаговой ДНК, а затем синтезируются структурные белки фага. Специфические фаговые мРНК появляются не сразу, а последовательно (Хесин и сотрудники, 1962, 1963). На ранних и поздних стадиях развития фагов Т2 и Т4 в клетке *E. coli* образуются различные наборы мРНК, синтезируемые на разных группах генов. Появление разных групп мРНК зависит от процессов синтеза белка и репликации фаговой ДНК. Модели, предлагаемые для объяснения этих явлений, исходят из рассмотрения сложной субъединичной структуры РНК-полимеразы, которая изменяется при воздействии белковых регуляторных факторов. Детальные молекулярные механизмы временно́й регуляции белкового синтеза пока неизвестны.

Эта регуляция реализуется, по-видимому, на всех стадиях биосинтеза белка. Регулируется работа полимераз, аминоацил-тРНК-синтетазы и рибосом. Установлено, что антибиотики влияют на трансляцию кода, воздействуя на рибосомы. Стрептомицин, нарушающий трансляцию и в бесклеточной системе, внедряется в 30 S-субъединицы рибосом.

Циклическая аденозинмонофосфорная кислота (цАМФ, см. с. 42) стимулирует работу генов на уровне транскрипции и служит химическим триггером транскрипции. Транскрипция начинается, когда комплекс цАМФ с белком-рецептором активирует некоторый промоторный участок ДНК в начале оперона. РНК-полимераза присоединяется к активированному промоторному участку и затем перемещается вдоль цепи ДНК, организуя синтез мРНК. Комплекс цАМФ-рецептор не содействует транскрипции при наличии специфического белка-репрессора. Циклическая АМФ может стимулировать транскрипцию ряда различных оперонов.

Итак, регуляция активных генов осуществляется с помощью различных регуляторных белков-репрессоров и активаторов транскрипции. С физической точки зрения наиболее интересным свойством этих белков является их способность «узнавать» специфические нуклеотидные последовательности ДНК. Установлено, что в комплексе с регуляторными белками сохраняется обычная *B*-подобная конформация ДНК. Узнавание белками их специфических связывающих мест на ДНК основывается на прямом «чтении» белком последовательности оснований в узкой и/или широкой бороздках ДНК. Специфичность связывания обеспечивается образованием большого числа водородных связей и других слабых взаимодействий между функциональными группами белка и основаниями ДНК. Одна и та же последовательность оснований может быть «прочитана» как со стороны узкой, так и со стороны широкой бороздки ДНК. Однако характер и пространственное расположение функциональных групп оснований — потенциальных доноров и акцепторов водородных связей — в узкой и широкой бороздках ДНК значительно отличаются. Поэтому часто говорят о двух каналах передачи информации. В узкой бороздке ДНК атомы O2 пиримидинов и N3 пуринов могут служить в качестве акцепторов водородных связей, в то время как 2-аминогруппа гуанина часто является донором водородной связи. Важной особенностью структуры ДНК является пространственная эквивалентность положений всех этих акцепторных групп для пуриновых и пиримидиновых оснований, находящихся в одной и той же полинуклеотидной цепи. Кроме того, атомы N3 пурина и O2 пиримидина в каждой паре оснований связаны осью симметрии второго порядка. Поэтому при «чтении» текста со стороны узкой бороздки ДНК АТ- и ГЦ-пары легко узнать, в то время как АТ- и ТА-пары различить трудно, так как они несут геометрически эквивалентные группы сходной химической природы.

В широкой бороздке ДНК атомы N7 аденина и гуанина занимают эквивалентные положения, и водородные связи с этими атомами позволяют отличить пуриновые основания от пиримидиновых. Другим важным свойством является то, что как доноры, так и акцепторы водородных связей (аминогруппы аденина и цитозина, атомы O4 тимина и O6 гуанина соответственно) попарно занимают весьма близкие, хотя и неидентичные положения. Поэтому при взаимодействии гипотетической пары донорной и акцепторных групп белка с упомянутыми выше группами оснований выполняются соотношения $А \approx Ц$ и $Т \approx Г$. Это «вырождение» можно снять, если образуется дополнительная водородная связь с N7-атомом пурина.

Структурные и термодинамические аспекты узнавания специфических нуклеотидных последовательностей в узкой бороздке ДНК в основном выяснены. Хорошо известно, что ряд антибиотиков пептидной природы связывается в узкой бороздке ДНК с определенными нуклеотидными последовательностями. Диста-

мицин А и нетропсин являются типичными примерами. В соответствии со стереохимической моделью, предложенной Заседателевым и соавторами для комплекса ДНК с дистамицином или его аналогом нетропсином, связанные молекулы этих антибиотиков занимают 5 пар оснований в узкой бороздке ДНК. Четыре амидные группы дистамицина служат в качестве доноров водородных связей для взаимодействия с N3-атомами аденина и/или

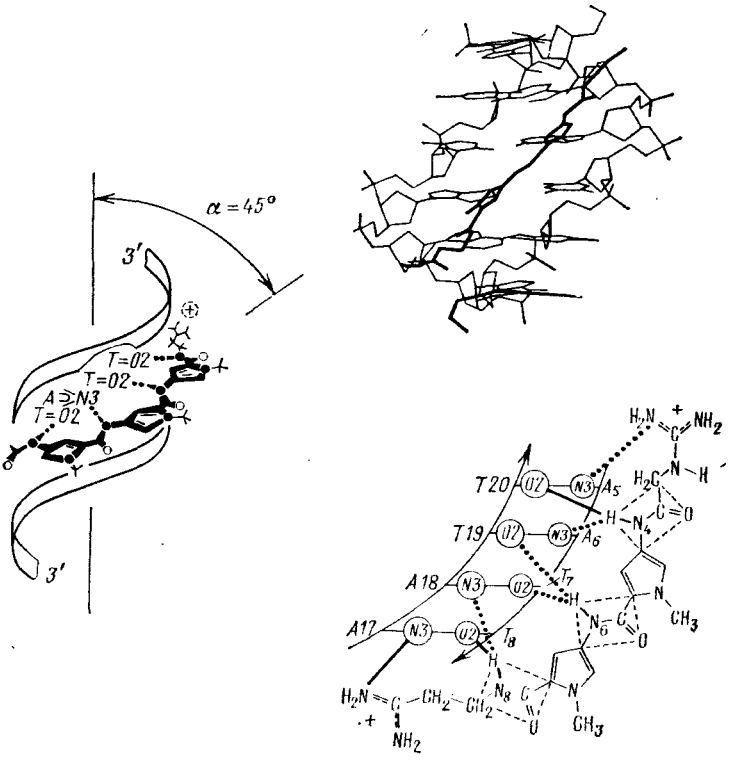


Рис. 8.16. Схема комплекса дистамицина с ДНК (Заседателев и др.). Пунктирные линии — водородные связи между амидными группами антибиотика О2 и атомами тимина и/или N3 атомами аденина. Справа — структура комплекса нетропсина и самокомплементарного додекамера (Дикерсон и др.)

О2 атомами пиридинов (рис. 8.16). Эта модель получила экспериментальное подтверждение. Рентгеноструктурное исследование структуры комплекса нетропсина с самокомплементарным додекамером ЦГЦЦААТТЦЦЦЦ показало, что нетропсин локализован в узкой бороздке ДНК и что в комплексе амидные группы антибиотика соединены водородными связями с N3-атомом аденина и О2-тимина. Водородные связи, образуемые амидными группами, являются вилочковыми, т. е. каждая амидная группа образует две водородные связи с атомами N3 аденина и О2 ти-

мина, находящимися в двух полинуклеотидных цепях. Можно предполагать, что, подобно дистамицину и нетропсину, другие лиганды, способные узнавать специфические нуклеотидные последовательности в узкой бороздке ДНК, также образуют спирали, изогеометричные спирали ДНК, и несут специфические реакционные центры. Примером является краситель Хехст 33258, бензимидазольные повторяющиеся единицы которого также могут образовывать спираль, изогеометричную спирали ДНК, как это было отмечено впервые Заседателевым и соавторами (рис. 8.17).

Остов полипептидной цепи может образовывать спиральные структуры с параметрами, близкими к двойной спирали ДНК в *B*- и *A*-формах. Как показали конформационные расчеты и построение молекулярных моделей, стереохимически возможны два типа спиральных структур, одна из которых (*t*) имитирует структуру повторяющихся N-метилпирролкарбоксамидных единиц дистамицина, а вторая (*g*) представляет собой регулярную спираль, в которой карбонильные группы остова могут образовывать водородные связи с 2-аминогруппами гуанина, находящимися в одной и той же полинуклеотидной цепи (рис. 8.18). Две антипараллельные, *tt* или *tg*, пептидные цепи можно расположить в узкой бороздке таким образом, что образуются водородные связи между пептидными группами двух цепей и основаниями ДНК. Этот структурный мотив был обнаружен экспериментально.

Двойная пептидная спираль, представленная на рис. 8.17, послужила стереохимическим основанием для кода ДНК-белкового узнавания, предложенного Гурским и соавторами, в соответствии с которым взаимодействие между белковыми радикалами аминокислотных остатков и пептидным остовом изменяет реакционную способность пептидных групп и обеспечивает детальную комплементарность «решеток» реакционных центров белка и ДНК.

Предложены модели, в соответствии с которыми узнавание осуществляется с помощью α-спиральных участков белка. Предполагается, что боковые радикалы аминокислотных остатков образуют специфические водородные связи с основаниями в широкой бороздке ДНК. Определение трехмерной структуры четырех регуляторных белков (CI- и CRO-репрессоров λ-фага, CAP-белка, репрессора триптофанового оперона) показало, что ДНК-связывающие домены этих белков имеют характерный двухспиральный мотив. Предложены модели ДНК-белковых комплексов, согласно которым одна из α-спиралей (α_3) находится в широкой бороздке и взаимодействует с основаниями ДНК, в то время как вторая (α_2) взаимодействует с сахарофосфатным остовом ДНК и обеспечивает правильную ориентацию спирали α_3 в комплексе. Предполагаемые геометрии для четырех специфических ДНК-белковых комплексов не являются полностью одинаковыми: положение спирали α_3 в широкой

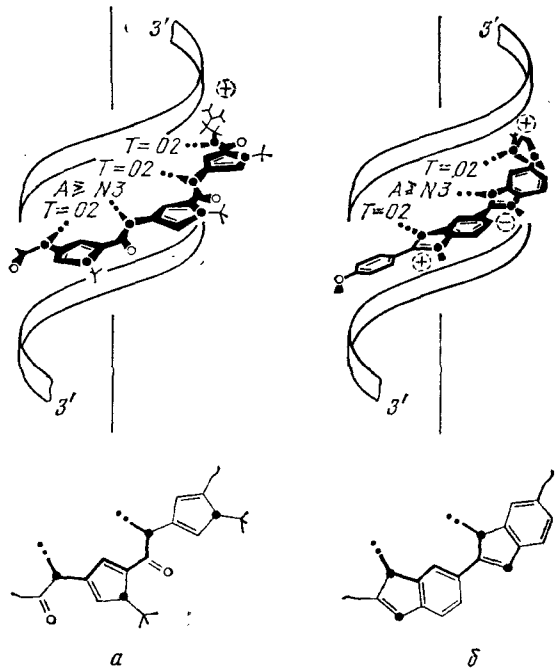


Рис. 8.17. Модели комплексов дистамицина (*а*) и красителя «Хехст» (*б*) с ДНК

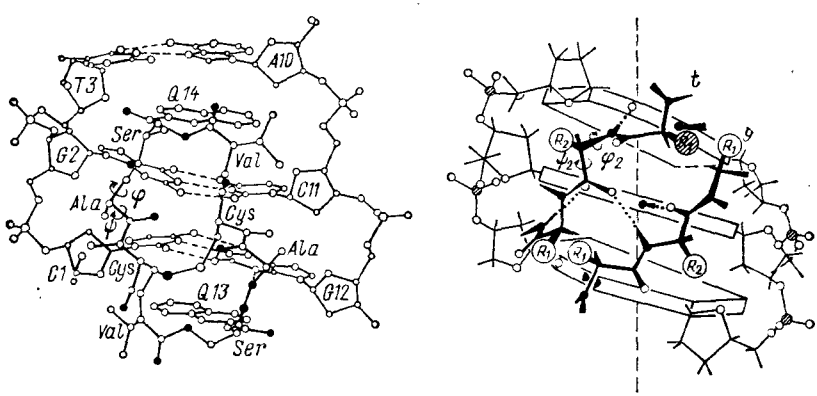


Рис. 8.18. Структура комплекса антибиотика триостина с самокомплементарным гексамером 5′ ЦГТАЦГ 3′ по данным Рича и др. Справа — модель узнавания нуклеотидных последовательностей в ДНК по Гурскому и др.

бороздке является различным для каждого из четырех упомянутых выше регуляторных белков. Общность трехмерной структуры этих белков нашла свое отражение и в гомологии аминокислотных последовательностей в пределах двухспиральной структурной единицы. Сравнение аминокислотных последовательностей для большого числа репрессоров и активаторов также показало наличие гомологии в аминокислотных последовательностях в ДНК-связывающих участках белков. Это свидетельствует о том, что двухспиральный структурный мотив может быть общим структурным элементом всех бактериальных репрессоров и активаторов. Хотя построение детальных моделей ДНК-белковых комплексов является большим успехом, соответствие между белковыми и нуклеиновыми последовательностями в комплексах остается неясным. Лишь определение трехмерной структуры ДНК-белковых комплексов позволит, вероятно, решить эту проблему, что откроет путь к управлению процессами регуляции активности генов.

Регуляция работы генов в клетках *эукариот* естественно является гораздо более сложной. Гены эукариот находятся в *хромосомах* — надмолекулярных структурах, представляющих собой *нуклеопротеиды* — организованные комплексы ДНК с белком.

Все соматические клетки данного многоклеточного организма содержат один и тот же набор генов, тождественный геному исходной зиготы. (Мы отвлекаемся от соматических мутаций.) В то же время клетки различных тканей отличаются друг от друга и морфологически, и функционально. Их различия сводятся к тому, что в разных клетках одного и того же организма функционируют различные белки. Это означает, что в разных клетках работают разные гены и молекулярный смысл *дифференцировки клеток* состоит в регуляции работы генов. В клетке данного сорта трансляция осуществляется лишь для малой доли имеющихся генов.

Белки, входящие в состав хроматина и хромосом, разделяются на *гистоны* и *негистоновые белки* (НГБ). Гистоны, представляющие собой основные белки, содержащие много Арг и Лиз, представлены пятью фракциями: H1, H2A, H2B, H3 и H4. Установлены первичные структуры гистонов, выделенных из различных организмов. Почти для всех фракций эта структура исключительно устойчива в эволюции. Так, гистоны H2 из гороха и из тимуса теленка разнятся лишь двумя аминокислотными остатками из ста двух. Постоянство первичной структуры гистонов, вероятно, связано с тем, что у гистонов функциональна вся молекула: некоторые ее участки ответственны за связывание с ДНК солевыми мостиками Арг, Лиз — фосфат, другие — за межбелковые взаимодействия. *Хроматин* построен из плотно упакованных *нуклеосом* — фрагментов, диаметром в 10 нм, на которые хроматин расщепляется под действием *нуклеаз*. Имеются мононуклеосомы трех сортов: МН1, содержащая 145 пар оснований (п. о.) ДНК и по две молекулы всех фракций гистонов,

кроме Н1; МН2, содержащая 160—170 п. о., те же 8 молекул гистонов, что и МН1, и еще одну молекулу Н1, и МН3, содержащая 200 п. о. и те же 9 молекул гистонов, что и МН2. Согласно Крику и Клугу, ДНК в нуклеосомах свернута вокруг белка в сверхспираль, причем эта сверхспирализация определяется не равномерным изгибанием двойной спирали, но резкими ее изломами примерно через каждые 20 п. о. (1975). К сворачиванию ДНК в сверхспираль приводит, по-видимому, именно нейтрализация отрицательных зарядов фосфатных групп положительными зарядами гистонов. Наличие 8 или 9 различных гистонов в нуклеосомах обеспечивает возможность большого их структурного многообразия. Цанев и Сендов предположили существование специфического кода для блокирования генов, считая, что кодирование определяется различными комбинациями пяти гистонов (1966).

ДНК в нуклеосоме завита в левую суперспираль; на один виток суперспирали приходится около 80 пар оснований, так что нуклеосома содержит $1^3/_4$ супервитков ДНК. Линейное расположение гистонов вдоль ДНК удалось установить методом химических сшивок (Мирзабеков). Укладка ДНК в нуклеосоме выяснена методом рентгеноструктурного анализа (Клуг). Соответствующая схема показана на рис. 8.19. Конформация ДНК остается близкой к стандартной *B*-форме. ДНК изгибается анизотропно — наибольшие изгибы происходят в направлении широкой бороздки двойной спирали. Эта анизотропия гибкости ДНК зависит от

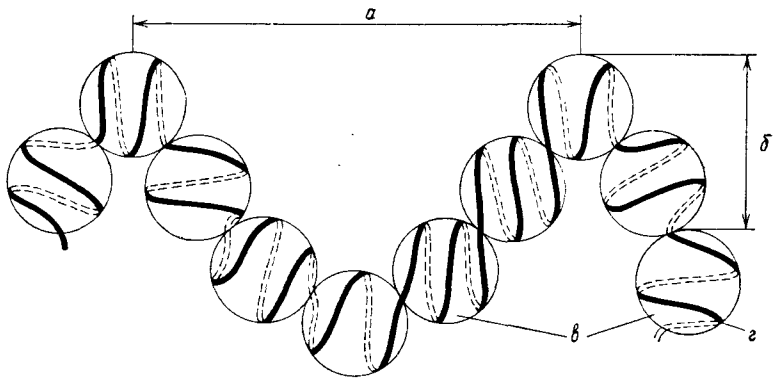


Рис. 8.19. Схема цепочки нуклеосом, образующих хроматиду: *а* — шаг спирали 50 нм, *б* — радиус спирали 13 нм, *в* — нуклеосомы, *г* — ДНК

нуклеотидной последовательности. Отсюда следует характер расположения нуклеосом на ДНК. Практически все нуклеотидные последовательности способны к образованию нуклеосом; однако на тех фрагментах ДНК, где нуклеосомы образуются, отдельные их позиции намного предпочтительнее всех остальных. К числу исключений относятся гомодезоксиполимеры полиА : полиТ и

полиГ : полиЦ — на них нуклеосомы не формируются. Согласно расчетам Журкина и Ульянова, эти полимеры обладают повышенной жесткостью на изгиб. Напротив, нуклеотидные последовательности с чередованием пуринов и пиримидинов в одной цепи ДНК изгибаются относительно легко и потому могут образовать нуклеосомы. На основании этих расчетов сформулирована концепция, объясняющая неслучайное расположение нуклеосом на ДНК конформационно-механическими свойствами двойной спирали, зависящими от последовательности оснований.

Имеются многочисленные косвенные данные, позволяющие предполагать, что расположение нуклеосом на ДНК влияет на уровень экспрессии генов. Скорее всего, гистоны, связываясь с регуляторными последовательностями, уменьшают их сродство к различным белкам, входящим в систему регуляции транскрипции.

Нуклеосомы — это только первый уровень компактизации ДНК в клеточном ядре. На втором уровне нуклеосомы объединяются в хроматиновую фибриллу толщиной 25—30 нм. В свою очередь фибрилла изогнута в петли, прикрепленные своими основаниями к ядерному матриксу (скелету). В одной петле содержится от 5 до 50 тысяч пар нуклеотидов. Такая многоэтажная иерархия структур приводит к чрезвычайно плотной упаковке ДНК. Так, в 46 хромосомах человека содержится около 1 м ДНК, а упакована она в ядре размером в несколько микрон.

Можно предположить, что многоуровневая организация ДНК повышает эффективность работы хромосомы как информационно-поисковой системы клетки. Действительно, компактное расположение сигнальных последовательностей ДНК около матрикса может в принципе облегчать поиск «нужной» петли ДНК, содержащей требуемый ген.

Механизм самосборки нуклеосом и хромосом пока неясен. Его исследование очень важно.

В ходе развития клетки конформации гистонов и НГБ и их ДНК-комплексов изменяются и геном испытывает функциональные изменения, становясь более или менее доступным действию регуляторных белков цитоплазмы. На гигантских хромосомах двукрылых насекомых на определенной стадии развития появляются *«пуффы»* — вздутые участки, являющиеся локусами наиболее интенсивного синтеза РНК. В этих участках происходят химические и конформационные изменения гистонов, что и обеспечивает изменение функциональности соответствующих генов. По-видимому, в «пуффах» гистоны слабее связаны с ДНК, они более доступны действию протеаз и легче отделяются. Соответственно в «пуффах» гистоны не мешают работе РНК-полимеразы. В нормальных условиях гистоны препятствуют транскрипции.

Георгиев исследовал механизм ингибирования синтеза РНК гистонами методом двойной радиоактивной метки. АТФ или ГТФ, меченные ^{32}Р-фосфатом, использовались для определения

инициации цепи РНК, а ^{14}С-УТФ — для определения общей скорости ее роста. Добавление гистонов уменьшало отношение $^{14}C/^{32}P$ в синтезируемой РНК. Это показывает, что либо происходит уменьшение скорости роста цепи, либо образуются сравнительно короткие цепи, т. е. гистоны мешают движению полимеразы вдоль матрицы. Матричная активность хроматина на порядок меньше, чем в свободной ДНК. Удаление гистонов из хроматина увеличивает его матричную активность.

Негистоновые белки содержат не основные, а кислотные остатки. НГБ очень гетерогенны. Их м. м. варьируют от 10 000 до 150 000. Они разнообразны функционально. Свойства и строение НГБ изучены еще недостаточно, но несомненно их участие в регуляции генов. Способность НГБ стимулировать синтез РНК в бесклеточной системе зависит от состояния их фосфорилирования. Сформулирована гипотеза, согласно которой ген включается присоединением негистонового белка к специфическому участку ДНК, репрессированному гистоном. НГБ фосфорилируются и приобретают отрицательные заряды. Поэтому они отталкивают также отрицательно заряженную ДНК и покидают ее вместе с положительно заряженными гистонами. Остается свободный участок ДНК, способный к транскрипции.

Геномы эукариот содержат множество повторяющихся генов и гены перевернутые (*палиндромы*). Участки структурных генов (*экзоны*) в ДНК перемежаются генетически нефункциональными последовательностями — *интронами*. В ходе транскрипции с каждой транскрибируемой единицей, названной *транскриптоном* (Георгиев), происходит ряд событий. Изготовление мРНК начинается с действия РНК-полимеразы на расстоянии в 20—30 нуклеотидов от последовательности ТАТА (ТАТА-бокс). Полимераза движется в направлении 5′ → 3′. 5′-конец «кэпируется» метилированным гуанозином, к которому присоединена трифосфатная группа. «Кэп» служит, по-видимому, для химической защиты 5′-конца. К 3′-концу присоединяется полиА длиною в 150—200 нуклеотидов. Первичный транскрипт (про-мРНК) может содержать до 200 000 нуклеотидов в среднем, однако его длина порядка 5000 звеньев. Совокупность этих явлений, реализуемая с помощью ряда специальных ферментов, называется *процессингом*. Он включает отделение интронов и других факторов и правильное объединение экзонов в цепь мРНК (*сплайсинг*). Схема этих событий показана на рис. 8.20. В процессинге участвует также ряд типов малых рибонуклеопротеидов (100—200 звеньев).

Главная роль процессинга заключается в регуляции экспрессии генов. Процессинг может идти по-разному — различные мРНК могут получаться из одного и того же первичного транскрипта. Недавно обнаружено, что РНК может реализовать процессинг и без участия ферментов.

В ряде случаев экзоны соответствуют определенным доменам в белке.

Установлены явления совместной регуляции целых совокупностей генов, что имеет определяющее значение для морфогенеза в ходе индивидуального развития (см. § 17.9). Строение зародыша задается короткой последовательностью нуклеотидов в ДНК, именуемой *гомеобоксом*. Гомеобокс ответствен за сегментацию тела членистоногих (*Drosophila*). Это доказывается изучением *гомеотических мутаций*, приводящих к макроскопическим

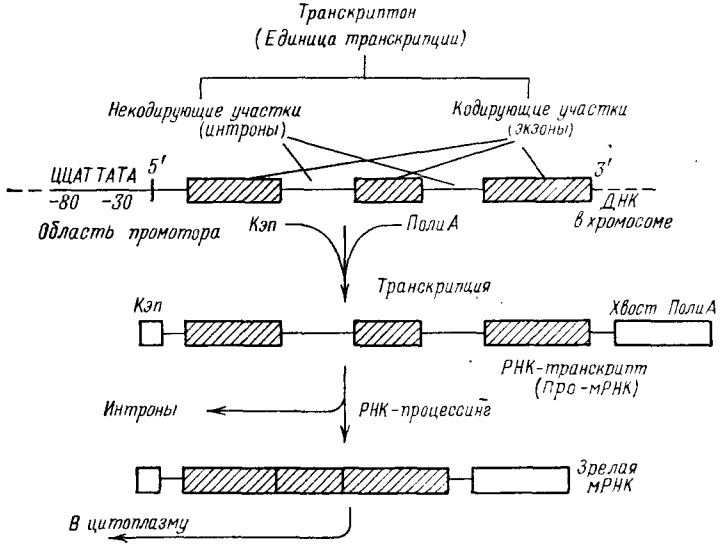


Рис. 8.20. Схема функционирования генома эукариот

событиям — к появлению лишней пары ног вместо антенн и т. д. Гомеотическая мутация выражается в превращении одной части тела в другую, в норме расположенную в ином сегменте.

Гомеобокс содержит около 180 пар оснований, что соответствует полипептиду длиной в 60 звеньев. Гомологичные гомеобоксы обнаружены у ряда организмов — у дрозофилы, у лягушки, у мышей и у человека.

В сороковых годах Мак-Клинток впервые установила, что гены обладают подвижностью. Участки геномов могут менять свои места (*транспозоны*), в геном могут включаться *плазмиды* (с. 268), играющие исходно роли или паразитов, или симбионтов. Возможен «*горизонтальный перенос*» генов от одних организмов к другим — главным образом у прокариот. Эти явления подробно рассмотрены в фундаментальном труде Хесина («Непостоянство генома», 1983).

Подвижные генетические элементы имеют сигнальное и регуляторное значение, они служат усилителями и промоторами РНК-полимераз, участвуют в *процессинге* и т. д. Георгиев изучил так называемые *транспозиционные взрывы* — явления одно-

временных транспозиций в ряде участков, происходящие с повышенной частотой. Такое поведение мобильных элементов имеет важное значение для мутационных процессов и для эволюции в целом (см. § 17.7). Транспозиционные взрывы — проявление специфической кооперативности генов.

Упомянутые выше многократные повторы в геномах создают возможности своего рода гомогенизации хромосом. Происходят

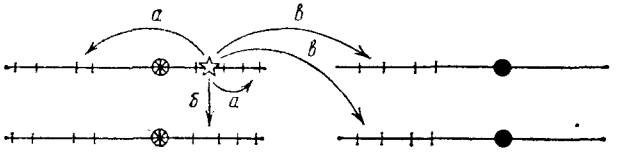


Рис. 8.21. Схема молекулярного драйва: *а* — внутрихромосомный драйв, *б* — драйв между гомологичными хромосомами, *в* — драйв между негомологичными хромосомами

перестройки повторных последовательностей, вызываемые неодинаковым хромосомным обменом (кроссинговером), переносом транспозонов и конверсией генов — направленной или стохастической неэквивалентностью соответствующих аллелей. Возникают возможности отклонений от законов Менделя. В результате может происходить «концертное» развитие популяции в генетическом направлении, отличном от такового у соседнего вида. На рис. 8.21 приведена схема возможных способов гомогенизации

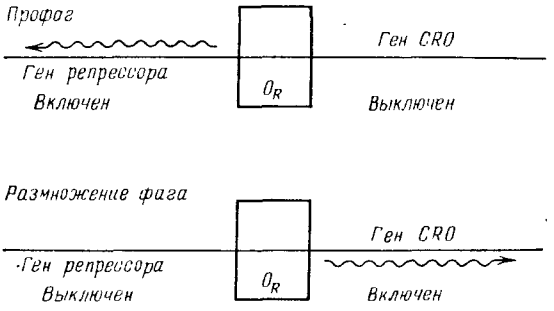


Рис. 8.22. Схема переключения оператора

хромосом посредством молекулярного драйва. Эти явления, требующие дальнейшего исследования, существенны для эволюции. Подвижность генов важна и для канцерогенеза.

Естественно, что явления такого рода изучены более детально в прокариотах и фагах. Остановимся на хорошо изученном случае генетического переключения бактериофага.

Некоторые штаммы *E. coli* содержат λ-фаг — «дремлющий» умеренный вирус. Его геном включен в геном бактерий и не дает о себе знать. Однако при индукции фаг размножается и

уничтожает клетки. ДНК λ-фага содержит 35—40 генов, кодирующих белки.

В «дремлющем» состоянии в профаге синтезируется лишь один белок, так называемый *λ-репрессор*. Он выключает действие всех остальных генов, кодирующих другие белки, но стимулирует работу гена, ответственного за его синтез.

Если фаг индуцирован и размножается, появляется другой белковый регулятор, именуемый CRO, выключающий ген λ-репрессора. И λ-репрессор, и CRO при своем действии связываются с одним и тем же участком λ-ДНК, называемым правым оператором (O_R). Происходит переключение O_R на действие первого или второго гена, что показано схематически на рис. 8.22. Молекулярный механизм переключения сводится к движению РНК-полимеразы вправо или влево вдоль ДНК фага.

Интересные и важные явления регуляции генов в целом не стали еще достоянием биофизики — лишь в отдельных случаях удалось построить убедительные физико-математические модели,

Глава 9

НЕРАВНОВЕСНАЯ ТЕРМОДИНАМИКА В БИОЛОГИИ

§ 9.1. Информация и энтропия

Изучая структуру и свойства биополимеров, мы до сих пор, как правило, ограничивались рассмотрением равновесных состояний. Пока речь идет о готовой структуре, это законно. Но возникновение структуры, т. е. биосинтез и самосборка, является совокупностью неравновесных процессов, протекающих необратимо. Тем более это относится к функционированию биологической системы как целого, к процессам эволюционного и индивидуального развития.

Как мы видели, организм представляет собой своего рода химическую машину, которая работает благодаря прямым и обратным молекулярным связям. Молекулярная сигнализация служит для передачи информационных сообщений. Соответственно общая физическая трактовка биологических систем основывается на теории информации, с которой неразрывно связана термодинамика.

Теория информации вводит меру *количества информации*. Допустим, что имеется P_0 различных равновероятных событий. Так, при бросании монеты $P_0 = 2$, при бросании кости $P_0 = 6$. Чем больше P_0, тем больше неопределенность до получения сообщения о событии и тем больше количество информации (далее называемое просто информацией) при получении сообщения. В начальной ситуации, до бросания монеты или кости, информация равна нулю, $I_0 = 0$, в конечной ситуации $I_1 \neq 0$. Очевидно, что мера информации должна быть связана с P_0. Естественно потребовать, чтобы информация была аддитивной для независимых событий (скажем, при бросании двух костей).

Таким образом, если имеются два набора событий P_{01} и P_{02}, так что полное число событий есть

$$P_0 = P_{01}P_{02} \tag{9.1}$$

(при бросании двух костей $36 = 6 \cdot 6$), то должно быть

$$I(P_{01}P_{02}) = I(P_{01}) + I(P_{02}). \tag{9.2}$$

Это соотношение удовлетворяется единственным решением

$$I = K \ln P_0, \tag{9.3}$$

причем константа K произвольна. Тем самым произвольно и основание логарифма. Обычно пользуются двоичной системой с основанием 2. Если образовать все возможные «слова» или последовательности двух чисел 0 и 1 длины n, то имеется $P = 2^n$ возможностей. Потребуем, чтобы

$$I = K \ln P = Kn \ln 2 = n, \tag{9.4}$$

т. е.

$$K = 1/\ln 2 = \log_2 e \tag{9.5}$$

и

$$I = \log_2 P. \tag{9.6}$$

При этом информация исчисляется в *битах*. Так, при $P_0 = 2$, $P_1 = 1$ (бросание монеты)

$$I = \log_2 P_0 - \log_2 P_1 = 1 - 0 = 1 \text{ бит}.$$

Сколько бит содержит произвольное трехзначное число? Первая цифра имеет 9 различных значений — от 1 до 9, вторая и третья — по 10 значений — от 0 до 9. Имеем

$$I = \log_2 9 + 2 \log_2 10 = 9{,}28 \text{ бит}.$$

Принятое определение информации соответствует двоичной системе, в которой любое число записывается в виде степеней числа 2 посредством цифр 0 и 1. Одна десятичная единица дает 3,32 бит, т. е. двоичная запись числа требует в среднем в 3,32 раза больше цифр, чем десятичная.

Допустим, что имеется сообщение, содержащее N последовательных ячеек,— текст из N букв. В каждой из N ячеек может находиться одна из M букв (в русском языке $M = 32$). В сообщении содержится N_1 букв А, N_2 букв Б и т. д. Имеем

$$N = \sum_{j=1}^{M} N_j. \tag{9.7}$$

Вероятность появления данной буквы

$$p_j = N_j/N, \quad j = 1, 2, \ldots, M, \tag{9.8}$$

причем

$$\sum_{j=1}^{M} p_j = 1. \tag{9.9}$$

Общее число различных последовательностей из N букв M-буквенного языка, т. е. число возможных различных сообщений, равно

$$P = \frac{N!}{\prod_{j=1}^{M} N_j!}. \tag{9.10}$$

Информация в одном сообщении равна (пользуемся формулой

Стирлинга, дающей хорошие результаты при $N_j > 100$)

$$I = K \ln P =$$

$$= K \left[\ln (N!) - \sum_{j=1}^{M} \ln (N_j!) \right] \approx K \left(N \ln N - \sum_{j=1}^{M} N_j \ln N_j \right), \quad (9.11)$$

или

$$I = -KN \sum_{j=1}^{M} p_j \ln p_j, \quad (9.12)$$

и информация, приходящаяся на букву,

$$i = I/N = -K \sum_{j=1}^{M} p_j \ln p_j. \quad (9.13)$$

Мы получили *формулу Шеннона* — более общее выражение для информации, соответствующее последовательности событий, обладающих неодинаковыми вероятностями p_j. При этом, если $K = 1/\ln 2$, информация выражается в битах, если $K = \kappa = 1{,}38 \times \times 10^{-23}$ Дж/К (постоянная Больцмана), I выражается в Дж/К, т. е. в энтропийных единицах. Назовем величину

$$S = -\kappa \sum_{j} p_j \ln p_j \quad (9.14)$$

энтропией. Далее мы увидим, что эта величина действительно есть физическая энтропия.

Покажем, что изменение неопределенности ведет к выигрышу информации. Перейдем от распределения вероятностей $P = (p_1, p_2, \ldots, p_M)$ к распределению $Q = (q_1, q_2, \ldots, q_M)$. Спрашивается, как изменяется при этом информация? При изменении вероятности события с p до 1 изменение информации равно

$$\Delta I = \kappa \ln \frac{1}{p} = -\kappa \ln p,$$

и при изменении $p \to q$

$$\Delta I = \kappa \ln (q/p). \quad (9.15)$$

При изменении всего распределения вероятностей $P \to Q$ изменение информации равно сумме парциальных изменений ΔI, умноженных на конечные вероятности q_j:

$$\Delta I = \kappa \sum_{j} q_j \ln \frac{q_j}{p_j}. \quad (9.16)$$

Эта величина всегда положительна, лишь при $Q = P$ изменение информации $\Delta I = 0$. Докажем это. При любых x кроме $x = 1$

$$\ln x > 1 - 1/x.$$

Следовательно,

$$\sum_{j} q_j \ln \frac{q_j}{p_j} > \sum_{j} q_j \left(1 - \frac{p_j}{q_j} \right) = \sum_{j} q_j - \sum_{j} p_j = 0.$$

Таким образом, знание о переходе $P \to Q$ уменьшает неопределенность и дает положительный выигрыш информации.

Пусть p_j — вероятности нахождения системы в состояниях с энергией E_j. Имеем

$$E = \sum_j p_j E_j. \tag{9.17}$$

Ищем максимум величины S/κ (9.14) при одновременном выполнении условий (9.9) и (9.17). Воспользуемся методом неопределенных множителей Лагранжа. Умножим (9.9) на $\alpha - 1$ и (9.17) на β, прибавим эти выражения к (9.14) и варьируем полученную сумму. Приравняв вариацию нулю, получим

$$\delta\left[\frac{1}{\kappa} S - (\alpha - 1)\sum_j p_j - \beta \sum_j p_j E_j\right] = 0. \tag{9.18}$$

Дифференцируя по p_j и приравнивая производную нулю, находим

$$-\ln p_j - 1 - (\alpha - 1) - \beta E_j = 0,$$

откуда

$$p_j = \exp(-\alpha - \beta E_j). \tag{9.19}$$

Подставляя (9.19) в (9.14), находим максимальную энтропию

$$\frac{1}{\kappa} S_{\max} = \alpha \sum p_j + \beta \sum p_j E_j = \alpha + \beta E. \tag{9.20}$$

С другой стороны, из (9.9) и (9.19) следует

$$1 = \sum_j p_j = e^{-\alpha} \sum_j e^{-\beta E_j} = e^{-\alpha} Z,$$

т. е.

$$e^{\alpha} = Z, \quad \alpha = \ln Z. \tag{9.21}$$

Получаем из (9.20)

$$E - \frac{1}{\kappa\beta} S_{\max} = -\frac{1}{\beta} \ln Z. \tag{9.22}$$

Это хорошо известное уравнение термодинамики и статистической физики. Здесь

$$Z = \sum_j \exp(-\beta E_j) \tag{9.23}$$

— *статистическая сумма*, $S_{\max}$ — равновесная энтропия, $\beta^{-1} = \kappa T$, T — абсолютная температура. Выражение (9.19) есть *функция распределения Больцмана*

$$p_j = \frac{\exp(-E_j/\kappa T)}{\sum_j \exp(-E_j/\kappa T)}. \tag{9.24}$$

Средняя энергия системы E и равновесная энтропия S (опускаем индекс max) — функции объема V. Выражение (9.22) дает

свободную энергию Гельмгольца

$$E - TS = -\kappa T \ln Z = F. \tag{9.25}$$

Свободная энергия Гиббса есть

$$G = F + pV = E + pV - TS = H - TS, \tag{9.26}$$

где H — энтальпия, p — давление.

Энергия и энтропия выражаются известными формулами:

$$E = \kappa T^2 \frac{d \ln Z}{dT}, \tag{9.27}$$

$$S = \kappa T \frac{d \ln Z}{dT} + \kappa \ln Z. \tag{9.28}$$

Таким образом, информационная энтропия (9.14) эквивалентна термодинамической (9.28). Один бит информации соответствует $\kappa \ln 2 = 10^{-23}$ Дж/К, т. е. очень малой термодинамической величине. Эта эквивалентность имеет реальный физический смысл — за полученную информацию нужно платить увеличением энтропии. Любое измерение связано с возрастанием энтропии окружающей среды. Энтропийная цена бита $\kappa \ln 2$ есть его минимальная стоимость. При бросании монеты получается один бит информации, но выделение энтропии вследствие нагревания монеты при ее ударе о пол много больше $\kappa \ln 2$. Монета может быть и сколь угодно большой.

Эквивалентность информации в битах и энтропии в Дж/К подобна эквивалентности массы и энергии по закону Эйнштейна

$$m = E/c^2.$$

Переводной множитель $c^{-2} \approx 1 \cdot 10^{-21}$ с^2/см^2 здесь также очень мал.

Оценим стоимость одного бита информации в единицах работы.

Допустим, что имеется идеальный газ, содержащий N молекул при давлении p и температуре T. В результате флуктуации объем газа уменьшается с V до $V - \delta V$. Работа, расходуемая на такое уменьшение, есть $W = p\delta V$. Вычислим выигрыш информации. Каждая молекула с вероятностью 1 находится в объеме V и с вероятностью $1 - \delta V/V$ в объеме $V - \delta V$. Для N молекул вероятность равна $(1 - \delta V/V)^N$. Выигрыш информации равен

$$\Delta I = K \ln \frac{1}{(1 - \delta V/V)^N} \approx KN \frac{\delta V}{V} \quad (\text{при } N \gg 1).$$

Следовательно,

$$\frac{W}{\Delta I} = \frac{p\delta V}{KN\delta V} V = \frac{pV}{KN} = \frac{\kappa T}{K}.$$

Работа, затрачиваемая на единицу информации, пропорциональна температуре, при которой определяется информация. Если ΔI

исчисляется в битах, то $K = 1/\ln 2$ и получение одного бита информации требует затраты энергии, равной $\varkappa T \ln 2$, что при $T = 300$ К составляет $2 \cdot 10^{-21}$ Дж. Это — нижняя оценка затраты энергии.

Возможна грубая, условная оценка количества информации, содержащейся в живом организме. По Блюменфельду основное количество информации в человеческом организме определяется упорядоченным расположением аминокислотных остатков в 7 кг белков, чему соответствует $3 \cdot 10^{25}$ остатков. Это дает $1{,}3 \cdot 10^{26}$ бит. Другие вклады значительно меньше: 150 г ДНК, содержащимся в человеческом организме, отвечает $6 \cdot 10^{23}$ бит, упорядоченному расположению 10^{13} клеток — $4 \cdot 10^{14}$ бит и упорядоченному расположению 10^{8} молекул биополимеров в клетке — всего лишь $2{,}6 \cdot 10^{9}$ бит. Белковая информация очень мала в термодинамической мере: $1{,}3 \cdot 10^{26}\ \varkappa \ln 2 = 1{,}3 \cdot 10^{3}$ Дж/К ≈ 300 кал/К. В энтропийных единицах упорядоченность живого организма заведомо мала, она значительно меньше упорядоченности куска горной породы той же массы уже потому, что организм содержит жидкости.

В этой оценке не учитывается *избыточность* (т. е. повторность) информации. Количество неизбыточной информации в организме много больше, чем в куске горной породы. Мы вернемся к этим вопросам в § 17.8.

Вся компьютерная техника связана с передачей и перекодировкой информационных сообщений. В принципе возможны компьютеры, построенные на молекулярно-биологической основе — использующие молекулы белков и нуклеиновых кислот для запасания, передачи и перекодировки информации. Это ведь и реализуется в живой природе. Построение искусственных молекулярных, а не транзисторных компьютеров — дело будущего.

Мы не рассматривали здесь важные проблемы, связанные с созданием новой информации и ее *рецепцией*.

В наших рассуждениях предполагалось, что информация кем-то или чем-то воспринимается. Однако молча принималось, что все, на что способен рецептор,— это отличить одну букву от другой. Для применений информационных представлений в теории связи такое предположение необходимо и достаточно. Процесс рецепции как физическое явление при этом не учитывается.

Как мы увидим (§ 17.8), применение теории информации в биологии требует анализа последствий рецепции сообщения. Учет этих последствий означает, что нужно изучить сам акт рецепции как необратимый, неравновесный процесс перехода рецепторной системы из менее устойчивого состояния в более устойчивое. При этом происходит запоминание информации.

Что касается *создания новой информации*, то, как это показал Кастлер, оно означает запоминание случайного выбора. Поясним это простым примером. Вы оставляете чемодан в автоматической камере хранения на вокзале и выбираете произвольный

шифр, чтобы эту камеру открыть. Этот набор цифр запоминается или записывается. Тем самым создана новая информация.

Новая информация создается в каждом акте полового размножения. Это — случайный выбор, никакими детерминистическими законами природы не предусмотрено, что именно данная пара произведет потомство. Новая особь несет новую информацию — рекомбинацию родительских геномов.

Теория запоминания информации — ее рецепции и создания — не разработана. При обсуждении запоминания не имеет смысла более говорить об эквивалентности информации и энтропии. Дело в том, что мы не располагаем пока определением энтропии для систем, далеких от равновесия, для процессов запоминания. Равновесная же система, естественно, ничего не помнит. Термодинамика систем, далеких от равновесия и обладающих долговременной памятью, еще не построена.

§ 9.2. Неравновесные процессы

Все изложенное относилось к равновесным системам, в которых энтропия максимальна. Живые системы неравновесны. Перейдем к рассмотрению неравновесных систем и процессов.

Рассмотрим систему, состоящую из двух подсистем, скажем, газ, объем которого разделен на две части. Предполагаем, что в обеих подсистемах заданы распределения вероятностей p_i' и p_i''. Соответствующие энтропии равны

$$S' = -\kappa \sum_i p_i' \ln p_i', \quad S'' = -\kappa \sum_i p_i'' \ln p_i''. \tag{9.28}$$

По-прежнему

$$\sum_i p_i' = 1, \qquad \sum_i p_i'' = 1 \tag{9.29}$$

и

$$E' = \sum_i p_i' E_i', \quad E'' = \sum_i p_i'' E_i''. \tag{9.30}$$

Считаем суммарную энергию постоянной:

$$E' + E'' = E. \tag{9.31}$$

Энтропия аддитивна:

$$S' + S'' = S. \tag{9.32}$$

Имеем

$$\frac{\partial S}{\partial E'} = \frac{\partial S'}{\partial E'} + \frac{\partial S''}{\partial E'} = \frac{\partial S'}{\partial E'} + \frac{\partial S''}{\partial (E - E'')} = \frac{\partial S'}{\partial E'} - \frac{\partial S''}{\partial E''} \tag{9.33}$$

и, согласно (9.20),

$$\frac{\partial S}{\partial E'} = \kappa(\beta' - \beta'') = \frac{1}{T'} - \frac{1}{T''}. \tag{9.34}$$

В неравновесной системе все ее характеристики и в том числе энтропия зависят от времени t. При контакте двух подсистем, обладающих, скажем, разными температурами, между ними происходит перенос какой-либо физической величины, скажем, энергии. Вследствие такого переноса изменяется распределение вероятностей. Имеем

$$S(t) = -\kappa \sum_i p_i(t) \ln p_i(t). \tag{9.35}$$

Следовательно, в данном случае (см. (9.34)),

$$\frac{dS}{dt} = \frac{\partial S}{\partial E'} \frac{dE'}{dt} = \left(\frac{1}{T'} - \frac{1}{T''}\right) \frac{dE'}{dt}. \tag{9.36}$$

Изменение энтропии во времени выражается произведением *обобщенного потока* энергии

$$J = \frac{dE'}{dt} \tag{9.37}$$

на *обобщенную силу*, равную

$$X = \frac{1}{T'} - \frac{1}{T''}. \tag{9.38}$$

В этом выводе мы сделали предположение о том, что и вне равновесия энтропия выражается так же, как в равновесии,— формула (9.35) подобна (9.14). Не углубляясь в тонкие физические вопросы, укажем, что это предположение аргументируется близостью к равновесию рассматриваемых процессов. Количественный критерий такой близости приведен ниже (с. 314).

Если система характеризуется многими экстенсивными переменными (такими, как энергия), изменение энтропии во времени представляется суммой произведений обобщенных сил и обобщенных потоков

$$\frac{dS}{dt} = \sum_j X_j J_j. \tag{9.39}$$

Изменение энтропии в открытой системе складывается из продукции энтропии внутри системы d_iS и из потока энтропии d_eS, т. е. из выделения энтропии в окружающую среду или поступления энтропии в систему из окружающей среды:

$$dS = d_iS + d_eS. \tag{9.40}$$

Согласно второму началу $d_iS \geqslant 0$, знак d_eS не определен (см. с. 17). В рассмотренном нами случае $d_eS = 0$ (система в целом замкнута) и $dS = d_iS$ — энтропия продуцируется вследствие теплообмена между двумя подсистемами, в результате которого рано или поздно установится тепловое равновесие. В общем случае выражение (9.39) представляет так называемую *функцию диссипации* σ — скорость продукции энтропии в единице объема.

В силу второго начала термодинамики

$$\frac{d_i S}{dt} = \int \sigma \, dV \geqslant 0 \tag{9.41}$$

и, согласно (9.39),

$$\sigma = \sum_j J_j X_j. \tag{9.42}$$

Здесь потоки и силы отнесены к единице объема.

С какими же обобщенными потоками и обобщенными силами приходится иметь дело в случае биологических открытых систем — клеток и организмов? Мы рассматриваем эти системы как химические, находящиеся при постоянной температуре. В них протекают химические реакции и происходит транспорт вещества. Для химической реакции роль потока играет скорость реакции v, т. е. производная *координаты реакции* ξ по времени:

$$J_{\text{хим}} = v = \frac{d\xi}{dt}. \tag{9.43}$$

Координата ξ выражает степень прохождения реакции:

$$\xi(t) = \xi(0) + \int_0^t v \, dt = \xi(0) + \int_0^t \frac{dn_\gamma}{\nu_\gamma}, \tag{9.44}$$

где n_γ — число молей реагента γ, ν_γ — стехиометрический коэффициент этого реагента в реакции. Течение химической реакции определяется разностью химических потенциалов реагентов и продуктов реакции, подобно тому, как поток тепловой энергии определяется разностью температур. Соответственно обобщенная сила для химического процесса есть

$$X_{\text{хим}} = -\frac{1}{T} \sum_\gamma \nu_\gamma \mu_\gamma \equiv \frac{\mathcal{A}}{T}, \tag{9.45}$$

где μ_γ — химический потенциал реагента γ.

Величина $\mathcal{A} = -\sum_\gamma \nu_\gamma \mu_\gamma$ называется *сродством*. Суммирование проводится по всем реагентам и продуктам.

Химический потенциал равен

$$\mu_\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial n_\gamma}\right)_{n_\gamma, p, T} = \mu_\gamma^0(p, T) + RT \ln c_\gamma, \tag{9.46}$$

где G — свободная энергия Гиббса, c_γ — концентрация (активность) реагента γ.

Константа равновесия реакции $K(p, T)$ определяется формулой, выражающей закон действия масс:

$$K(p, T) = c_{1\text{eq}}^{\nu_1} c_{2\text{eq}}^{\nu_2} \ldots c_{r\text{eq}}^{\nu_r} = \exp\left(-\frac{1}{RT} \sum_{\gamma=1}^{r} \nu_\gamma \mu_\gamma^0\right). \tag{9.47}$$

Индекс eq обозначает равновесную концентрацию. В состоянии равновесия

$$\mathcal{A}_{eq} = -\sum_\gamma \nu_\gamma \mu_\gamma^0 - RT\sum_\gamma \nu_\gamma \ln c_{\gamma eq} = -\sum_\gamma \nu_\gamma \mu_\gamma^0 - RT \ln K(p, T) = 0. \quad (9.48)$$

Следовательно, сродство выражается формулой

$$\mathcal{A} = RT \ln \frac{K(p, T)}{c_1^{\nu_1} c_2^{\nu_2} \dots c_r^{\nu_r}}. \quad (9.49)$$

С другой стороны, согласно (9.44) — (9.46)

$$\mathcal{A} = -\sum_\gamma \nu_\gamma \frac{\partial G}{\partial n_\gamma}.$$

Но

$$\left(\frac{\partial G}{\partial \xi}\right)_{p,T} = \sum_\gamma \frac{\partial G}{\partial n_\gamma}\frac{dn_\gamma}{d\xi} = \sum_\gamma \frac{\partial G}{\partial n_\gamma}\nu_\gamma.$$

Следовательно,

$$\mathcal{A} = -\left(\frac{\partial G}{\partial \xi}\right)_{p,T}. \quad (9.50)$$

§ 9.3. Сопряжение потоков

Обобщенные потоки J_i зависят от обобщенных сил, и наоборот — скорость химической реакции зависит от сродства, поток тепловой энергии — от разности температур. В линейном приближении

$$J_i = \sum_{j=1}^{n} L_{ij} X_j, \quad i, j = 1, 2, \dots, n, \quad (9.51)$$

где L_{ij} — *феноменологические коэффициенты.*

Простые примеры линейных соотношений — закон теплопроводности (поток теплоты, обобщенная сила — разность обратных температур), закон Ома (поток — электрический ток, сила — разность потенциалов), закон диффузии Фика (поток вещества, сила — разность концентраций) и т. д.

Вблизи равновесия, согласно *теореме Онзагера*, феноменологические коэффициенты L_{ij} образуют симметричную матрицу, т. е.

$$L_{ij} = L_{ji}. \quad (9.52)$$

Это положение строго следует из принципа микроскопической обратимости.

Соотношения, обратные (9.51), можно записать в виде

$$X_i = \sum_{j=1}^{n} R_{ij} J_j, \quad (9.53)$$

причем коэффициенты R_{ij} также образуют симметричную матрицу.

Вследствие того, что $\sigma \geqslant 0$, на феноменологические коэффициенты L_{ij} (и соответственно R_{ij}) наложены определенные условия. Рассмотрим без

ограничения общности случай двух сил и двух потоков:

$$J_1 = L_{11}X_1 + L_{12}X_2, \qquad J_2 = L_{21}X_1 + L_{22}X_2. \tag{9.54}$$

Согласно (9.42) имеем

$$\sigma = L_{11}X_1^2 + (L_{12} + L_{21})\,X_1X_2 + L_{22}X_2^2 \geqslant 0. \tag{9.55}$$

Функция диссипации σ положительна при любых отличных от нуля значениях переменных X_1 и X_2 и обращается в нуль, лишь если $X_1 = X_2 = 0$. Следовательно,

$$L_{11} > 0, \qquad L_{22} > 0 \tag{9.56}$$

и

$$(L_{12} + L_{21})^2 < 4L_{11}L_{22}. \tag{9.57}$$

Вследствие симметрии коэффициентов, $L_{12} = L_{21}$,

$$L_{12}^2 < L_{11}L_{22}. \tag{9.57а}$$

Знак недиагонального коэффициента L_{12} может быть любым. В общем случае

$$L_{jj} > 0, \; L_{ii}L_{jj} > L_{ij}^2. \tag{9.58}$$

Следует подчеркнуть, что условие $\sigma \geqslant 0$ относится к сумме $\sum_i X_iJ_i$ в целом. Отдельные члены этой суммы могут быть и отрицательными. Это означает, что отдельный поток J_i невозможен, так как $X_iJ_i < 0$. Иными словами, такой поток противоречил бы второму началу. Однако благодаря сопряжению с другими потоками, которым отвечают положительные значения $X_jJ_j > 0$, в открытой системе оказывается возможным поток, немыслимый в системе замкнутой. Должно лишь выполняться условие

$$\sum_{j \neq i} X_jJ_j > |\,X_iJ_i\,|.$$

Сопряжение определяется отличием от нуля недиагональных коэффициентов L_{ij}. Приведем пример: смесь двух газов в сосуде, стенки которого находятся при различных температурах, самопроизвольно разделяется так, что у горячей стенки больше содержание одного газа, у холодной — другого. Это явление *термодиффузии*. Поток вещества идет в направлении, противоположном направлению падения концентрации, так как он сопряжен с потоком теплоты, идущим от горячей стенки к холодной. Дефицит энтропии в одном процессе перекрывается ее избыточной продукцией в другом.

Мы видим, что продукция энтропии в открытой системе в принципе обеспечивает протекание процессов, невозможных в изолированных системах. Это положение важно для понимания биологических систем.

Потоки J_i и силы X_i могут быть как скалярными, так и векторными. Допустим, что имеются два потока — скалярный J_s и векторный $\boldsymbol{J}_v$:

$$J_s = L_{ss}X_s + \boldsymbol{L}_{sv}\boldsymbol{X}_v, \quad \boldsymbol{J}_v = \boldsymbol{L}_{vs}X_s + \mathrm{L}_{vv}\boldsymbol{X}_v. \tag{9.59}$$

Коэффициент L_{ss} есть скаляр, $\boldsymbol{L}_{sv}$ и $\boldsymbol{L}_{vs}$ — векторы, наконец,

L_{vv} как коэффициент пропорциональности между двумя векторами X_v и J_v есть тензор. Если система изотропна, то сила не может быть причиной потока, имеющего другую тензорную размерность — скаляр не может быть причиной вектора и вектор — скаляра (*принцип Кюри*). Следовательно, в этом случае $L_{sv} = L_{vs} = 0$ и

$$J_s = L_{ss}X_s, \quad J_v = \mathrm{L}_{vv}X_v.$$

Сопряжение между скалярными и векторными процессами отсутствует в изотропной системе.

Докажем это утверждение. Тензорная величина ранга n преобразуется при ортогональном преобразовании координат как

$$L'_{i_1 i_2 \ldots i_n} = \sum_{j_1 j_2 \ldots j_n} U(j_1, i_1)\, U(j_2, i_2) \ldots U(j_n, i_n)\, L_{j_1 j_2 \ldots j_n},$$

где j_k, i_k — декартовы координаты, $U(j_k, i_k)$ — элементы матрицы преобразования, определитель которой равен ± 1. Если система изотропна, то она инвариантна относительно отражения в центре (инверсии), т. е. относительно преобразования $x' = -x$, $y' = -y$, $z' = -z$, которое можно записать так:

$$r' = \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix} r \equiv Ir.$$

Если $U = I$, то тензор L преобразуется по закону

$$\mathrm{L}' = (-1)^n \mathrm{L}.$$

Но в силу инвариантности $\mathrm{L}' = \mathrm{L}$, и, следовательно, все коэффициенты при L с нечетными n обращаются в нуль. В нашем случае для L_{sv} и L_{vs} имеем $n = 1$. Значит, эти коэффициенты равны нулю.

Вследствие инвариантности изотропной системы относительно вращений тензор L_{vv} приобретает форму

$$\mathrm{L}_{vv} = L_{vv} \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix},$$

т. е. обращается в скаляр.

Если система анизотропна, но имеет центр симметрии (любые кристаллы, построенные из симметричных молекул и лишенные винтовой симметрии), то инвариантность относительно инверсии сохраняется и по-прежнему $L_{sv} = L_{vs} = 0$.

§ 9.4. Сопряжение химических реакций

Для биологии особенно важно сопряжение химических реакций друг с другом и с процессом диффузии.

Рассмотрим простейшую химическую реакцию вблизи равновесия:

$$\mathrm{A} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} \mathrm{B}.$$

Кинетическое уравнение реакции имеет вид

$$\dot{c}_\mathrm{B} = -\dot{c}_\mathrm{A} = k_1 c_\mathrm{A} - k_{-1} c_\mathrm{B}. \qquad (9.60)$$

Поток, т. е. скорость реакции, есть

$$J_{\text{хим}} = v = -\dot{c}_A = \dot{c}_B. \tag{9.61}$$

В равновесии $v = 0$, $(\dot{c}_A)_{eq} = (\dot{c}_B)_{eq} = 0$, т. е.

$$k_1 (c_A)_{eq} = k_{-1} (c_B)_{eq}.$$

Константа равновесия равна

$$K = k_1/k_{-1} = (c_B)_{eq}/(c_A)_{eq}.$$

Допустим, что система неравновесна, но близка к равновесию. Тогда

$$c_A = (c_A)_{eq} + \alpha_A, \quad c_B = (c_B)_{eq} + \alpha_B,$$

причем отклонения от равновесных концентраций α_A, α_B малы:

$$\alpha_A \ll (c_A)_{eq}, \quad \alpha_B \ll (c_B)_{eq}.$$

Очевидно, что

$$c_A + c_B = (c_A)_{eq} + (c_B)_{eq}$$

и

$$\alpha_A + \alpha_B = 0.$$

При таких условиях

$$J_{\text{хим}} = k_1 ((c_A)_{eq} + \alpha_A) - k_{-1} ((c_B)_{eq} + \alpha_B) = \alpha_A (k_1 + k_{-1}) = k_1 \alpha_A \frac{1+K}{K}. \tag{9.62}$$

Сродство в этом случае равно

$$\mathcal{A} = \mu_A - \mu_B. \tag{9.63}$$

В равновесии $(\mu_A)_{eq} = (\mu_B)_{eq}$ и $\mathcal{A} = 0$. Линейная термодинамика дает (ср. (9.45))

$$J_{\text{хим}} = v = L \frac{\mathcal{A}}{T} = L \frac{\mu_A - \mu_B}{T}, \tag{9.64}$$

где L — феноменологический коэффициент. Пользуясь выражением для химического потенциала (9.46), находим

$$\begin{aligned}
\mathcal{A} &= \mu_A^0 + RT \ln (c_A)_{eq} + RT \ln \left(1 + \frac{\alpha_A}{(c_A)_{eq}}\right) - \\
&- \mu_B^0 - RT \ln (c_B)_{eq} - RT \ln \left(1 + \frac{\alpha_B}{(c_B)_{eq}}\right) = \\
&= RT \left[\ln \left(1 + \frac{\alpha_A}{(c_A)_{eq}}\right) - \ln \left(1 + \frac{\alpha_B}{(c_B)_{eq}}\right)\right] \approx \\
&\approx RT \left[\frac{\alpha_A}{(c_A)_{eq}} - \frac{\alpha_B}{(c_B)_{eq}}\right] = RT \frac{\alpha_A}{(c_A)_{eq}} \frac{1+K}{K},
\end{aligned} \tag{9.65}$$

и, следовательно,

$$J_{\text{хим}} = \frac{LR}{(c_A)_{eq}} \alpha_A \frac{1+K}{K}. \tag{9.66}$$

Сравнивая (9.66) с (9.62), находим значение коэффициента L:

$$L = k_1 (c_A)_{eq}/R. \qquad (9.67)$$

Так как $|\alpha_A| \ll (c_A)_{eq}$ и $|\alpha_B| / (c_B)_{eq} = |\alpha_A| / (c_B)_{eq} \ll 1$, имеем

$$\alpha_A / (c_A)_{eq} \ll (c_B)_{eq} / (c_A)_{eq} = K.$$

Следовательно,

$$\frac{\alpha_A}{(c_A)_{eq}} \ll K\left(1 - \frac{\alpha_A}{(c_A)_{eq}}\right) \approx K,$$

или

$$\frac{\alpha_A}{(c_A)_{eq}} \frac{1+K}{K} \ll 1,$$

т. е. согласно (9.65)

$$\mathscr{A}/RT \ll 1. \qquad (9.68)$$

Это и есть условие близости к равновесию, эквивалентное $\alpha_A \ll (c_A)_{eq}$. Докажем, что из этого условия непосредственно следует линейное соотношение (9.64). Представим скорость реакции в виде

$$v = \dot{c}_B = k_1 c_A - k_{-1} c_B = k_1 c_A \left(1 - \frac{k_{-1}}{k_1} \frac{c_B}{c_A}\right) = k_1 c_A \left(1 - \frac{1}{K} \frac{c_B}{c_A}\right)$$

и сродство $\mathscr{A}$ в виде (ср. (9.49))

$$\mathscr{A} = RT \ln \frac{K}{c_A^{-1} c_B}.$$

Отсюда

$$c_B / c_A = K \exp(-\mathscr{A}/RT).$$

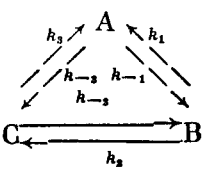
Однако, если справедливо условие близости к равновесию (9.68), то, разлагая экспоненту в ряд и ограничиваясь линейным членом, получаем

$$v = \frac{k_1 c_A}{R} \frac{\mathscr{A}}{T} = L \frac{\mathscr{A}}{T}.$$

Вблизи равновесия $c_A \approx (c_A)_{eq}$. Следовательно, снова имеем (см. (9.67))

$$L = k_1 (c_A)_{eq}/R.$$

Рассмотрим теперь сопряжение нескольких реакций. Допустим, что три реакции образуют *цикл*



Потоки равны

$$J_1 = k_1 c_A - k_{-1} c_B, \quad J_2 = k_2 c_B - k_{-2} c_C, \quad J_3 = k_3 c_C - k_{-3} c_A. \tag{9.69}$$

Значения сродства

$$\begin{aligned} \mathcal{A}_1 &= \mu_A - \mu_B, \quad \mathcal{A}_2 = \mu_B - \mu_C, \\ \mathcal{A}_3 &= \mu_C - \mu_A, \quad \mathcal{A}_1 + \mathcal{A}_2 + \mathcal{A}_3 = 0. \end{aligned} \tag{9.69a}$$

Функция диссипации, выраженная через независимые переменные и умноженная на T, равна

$$\sigma T = J_1 \mathcal{A}_1 + J_2 \mathcal{A}_2 + J_3 \mathcal{A}_3 = (J_1 - J_3) \mathcal{A}_1 + (J_2 - J_3) \mathcal{A}_2. \tag{9.70}$$

Потоки $J_1 - J_3$ и $J_2 - J_3$ независимы. Имеем

$$J_1 - J_3 = L_{11} \mathcal{A}_1 + L_{12} \mathcal{A}_2, \quad J_2 - J_3 = L_{21} \mathcal{A}_1 + L_{22} \mathcal{A}_2. \tag{9.71}$$

В равновесии $\mu_A^{eq} = \mu_B^{eq} = \mu_C^{eq}$, $\mathcal{A}_1^{eq} = \mathcal{A}_2^{eq} = 0$, $J_1 - J_3 = J_2 - J_3 = 0$ и $J_1 = J_2 = J_3 = 0$. Потоки равны нулю согласно принципу детального равновесия, из которого следует важное соотношение для циклических кинетических процессов:

$$k_1 k_2 k_3 = k_{-1} k_{-2} k_{-3}. \tag{9.72}$$

Вблизи равновесия

$$J_1 = k_1 \alpha_A - k_{-1} \alpha_B, \quad J_2 = k_2 \alpha_B - k_{-2} \alpha_C, \quad J_3 = k_3 \alpha_C - k_{-3} \alpha_A \tag{9.73}$$

и

$$\begin{aligned} \mathcal{A}_1 &= RT \left(\frac{\alpha_A}{(c_A)_{eq}} - \frac{\alpha_B}{(c_B)_{eq}} \right) = \frac{RT}{k_1 (c_A)_{eq}} (k_1 \alpha_A - k_{-1} \alpha_B), \\ \mathcal{A}_2 &= RT \left(\frac{\alpha_B}{(c_B)_{eq}} - \frac{\alpha_C}{(c_C)_{eq}} \right) = \frac{RT}{k_2 (c_B)_{eq}} (k_2 \alpha_B - k_{-2} \alpha_C). \end{aligned} \tag{9.74}$$

Отсюда

$$J_1 = \frac{k_1 (c_A)_{eq}}{RT} \mathcal{A}_1, \quad J_2 = \frac{k_2 (c_B)_{eq}}{RT} \mathcal{A}_2, \quad J_3 = - \frac{k_3 (c_C)_{eq}}{RT} (\mathcal{A}_1 + \mathcal{A}_2).$$

Следовательно,

$$\begin{aligned} J_1 - J_3 &= \frac{k_1 (c_A)_{eq} + k_3 (c_C)_{eq}}{R} \frac{\mathcal{A}_1}{T} + \frac{k_3 (c_C)_{eq}}{R} \frac{\mathcal{A}_2}{T}, \\ J_2 - J_3 &= \frac{k_3 (c_C)_{eq}}{R} \frac{\mathcal{A}_1}{T} + \frac{k_2 (c_B)_{eq} + k_3 (c_C)_{eq}}{R} \frac{\mathcal{A}_2}{T}. \end{aligned} \tag{9.75}$$

Находим

$$L_{11} = (k_1 (c_A)_{eq} + k_3 (c_C)_{eq})/R, \quad L_{22} = (k_2 (c_B)_{eq} + k_3 (c_C)_{eq})/R$$

и

$$L_{12} = L_{21} = k_3 (c_C)_{eq}/R.$$

Теорема Онзагера $L_{ij} = L_{ji}$ автоматически выполняется при близости к равновесию.

Сопряжение химических реакций в открытой системе делает возможным протекание эндергонических реакций, запрещенных в замкнутых системах, так как при этих реакциях возрастает свободная энергия. Мы уже встречались с такого рода процессами — в частности, при образовании белковых цепей. Образование каждой пептидной связи происходит с выделением одной молекулы воды. Так как в клетке вода содержится в избытке, должна превалировать обратная реакция гидролиза пептидных связей. Но, как мы видели, поликонденсация сопряжена с экзергонической реакцией расщепления АТФ (см. гл. 8), и функция диссипации в целом положительна. Сопряжение эндергонических процессов с гидролизом АТФ имеет общее значение в биологии. Посредством сопряжения реализуется универсальная роль АТФ как донора свободной энергии, необходимой для протекания эндергонических процессов. Если бы клетки и организмы были изолированными системами, АТФ не могла бы играть этой роли.

Таким образом, неравновесная термодинамика уже в линейном приближении доказывает возможность протекания в открытых системах процессов, запрещенных в замкнутых системах. Это имеет фундаментальное значение для биологии.

§ 9.5. Стационарные состояния линейных систем

Как об этом уже говорилось в первой главе (с. 17), открытая система может находиться в стационарном, хотя и неравновесном состоянии. В этом состоянии продукция энтропии внутри системы в точности компенсируется оттоком энтропии в окружающую среду, так что суммарная энтропия системы не меняется:

$$dS = d_i S + d_e S = 0. \tag{9.76}$$

Берталанффи — один из основоположников термодинамики открытых биологических систем — называл такое стационарное состояние состоянием проточного равновесия. Оно многими особенностями отличается от истинного равновесия.

Стационарное состояние открытой системы реализуется, если на систему наложены ограничения, фиксирующие постоянные значения некоторой совокупности обобщенных сил, причем остальные обобщенные силы могут меняться. Если X_1, X_2, ..., X_j постоянны, а X_{j+1}, X_{j+2}, ..., X_n свободно изменяются, то

$$J_i = 0 \quad \text{для} \quad i > j, \quad J_i \neq 0 \quad \text{для} \quad i \leqslant j.$$

Энтропия такой системы не достигает максимума, и функция диссипации отлична от нуля. Допустим, что система обменивается с окружающей средой и веществом, и энергией, но масса

ее остается постоянной. В системе имеется тепловой поток J_T, поток вещества $J_M = 0$. Следовательно,

$$\sigma = J_T X_T + J_M X_M \tag{9.77}$$

и

$$J_T = L_{11} X_T + L_{12} X_M \neq 0, \quad J_M = L_{21} X_T + L_{22} X_M = 0. \tag{9.78}$$

Считая фиксированной силу X_T (скажем, это фиксированная разность температур), имеем

$$\sigma = L_{11} X_T^2 + (L_{12} + L_{21}) X_T X_M + L_{22} X_M^2. \tag{9.79}$$

Дифференцируем это выражение по X_M при $X_T = \text{const}$:

$$\frac{\partial \sigma}{\partial X_M} = 2L_{22} X_M + (L_{12} + L_{21}) X_T.$$

Если система близка к равновесию и выполняется теорема Онзагера, то $L_{12} = L_{21}$ и

$$\frac{\partial \sigma}{\partial X_M} = 2 (L_{12} X_T + L_{22} X_M) = 2J_M = 0. \tag{9.80}$$

Вторая производная

$$\frac{\partial^2 \sigma}{\partial X_M^2} = 2L_{22} > 0.$$

Следовательно, в стационарном состоянии, близком к равновесию, продукция энтропии σ минимальна. Это *теорема Пригожина*. Она непосредственно связана с теоремой Онзагера и справедлива лишь в пределах применимости линейной термодинамики, т. е. при независимости коэффициентов L_{ij} от X_i.

Если X_T также может изменяться произвольным образом, то $J_T = J_M = 0$, $\sigma = 0$ и система достигает равновесия.

Рассмотрим открытую химическую систему. Вещество A поступает в нее извне, претерпевает ряд последовательных превращений внутри системы, и конечный продукт F покидает систему:

$$\rightarrow \mathrm{A} \xrightarrow{1} \mathrm{B} \xrightarrow{2} \mathrm{C} \rightarrow \cdots \xrightarrow{r} \mathrm{F} \rightarrow$$

Кинетические уравнения имеют вид

$$\frac{dn_\mathrm{A}}{dt} = \frac{d_{\mathrm{ex}} n_\mathrm{A}}{dt} - v_1, \quad \frac{dn_\mathrm{B}}{dt} = v_1 - v_2, \ \ldots, \ \frac{dn_\mathrm{F}}{dt} = \frac{d_{\mathrm{ex}} n_\mathrm{F}}{dt} + v_r, \tag{9.81}$$

где производные с индексом ex характеризуют обмен с внешней средой.

В стационарном состоянии содержание всех реагентов в проточной системе постоянно:

$$\dot{n}_i = 0 \quad (i = \mathrm{A}, \mathrm{B}, \ldots, \mathrm{F}).$$

Следовательно, все скорости выравниваются:

$$\frac{d_{ex}n_A}{dt} = v_1 = v_2 = \ldots = v_r = -\frac{d_{ex}n_F}{dt} = v. \qquad (9.82)$$

Это можно иллюстрировать наглядной моделью. Представим течение химической реакции течением жидкости. Если система замкнута, т. е. жидкость не поступает в сосуды и не вытекает наружу, то со скоростью, определяемой отверстием крана, вся жидкость перельется из верхнего сосуда в нижний и установится равновесное состояние (рис. 9.1). Уровень жидкости в нижнем сосуде представит степень прохождения реакции в таком состоянии.

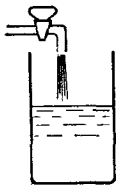


Рис. 9.1. Модель замкнутой системы

Если система открытая, проточная, то и в верхнем, и в нижнем сосудах установится определенный уровень жидкости, не соответствующий равновесию (рис. 9.2). Этот уровень будет зависеть от стационарной скорости течения, т. е. от степени поворота крана. Мы видим, что кран моделирует катализатор. В закрытой системе конечная степень прохождения реакции не зависит от ее скорости — от поворота крана; в конечном счете устанавливается постоянный уровень жидкости в нижнем сосуде. В открытой системе не только скорость, но и степень прохождения реакции зависит от катализатора. При изменении поворота крана устанавливаются новые уровни жидкости, новое стационарное состояние.

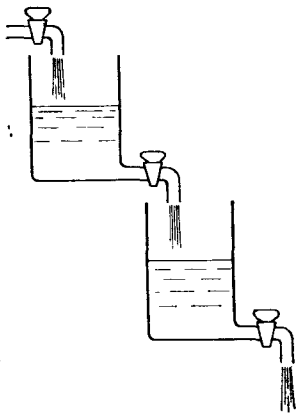


Рис. 9.2. Модель открытой системы

Докажем, что условие постоянства скоростей эквивалентно минимуму производства энтропии. Имеем для нашей системы

$$T\sigma = \mathcal{A}_A \frac{d_{ex}n_A}{dt} + \sum_{i=1}^{r} \mathcal{A}_i v_i + \mathcal{A}_F \frac{d_{ex}n_F}{dt}, \qquad (9.83)$$

где

$$\mathcal{A}_A = \mu_A^{(1)} - \mu_A^{(2)}, \quad \mathcal{A}_F = \mu_F^{(1)} - \mu_F^{(2)},$$

верхний индекс 1 относится к системе, а 2 — к окружающей среде. В стационарном состоянии

$$T\sigma = \left(\mathcal{A}_A + \sum_i \mathcal{A}_i - \mathcal{A}_F\right) v = \mathcal{A}v > 0, \qquad (9.84)$$

где $\mathcal{A}$ соответствует суммарному процессу $A^{(2)} \to F^{(2)}$. С другой

стороны, в линейной области

$$\sigma = \sum_{i=1}^{r+2} \sum_{j=1}^{r+2} L_{ij} \frac{\mathcal{A}_i}{T} \frac{\mathcal{A}_j}{T} > 0. \tag{9.85}$$

Определение минимума (9.85) при данном значении суммарного сродства $\mathcal{A}$ проводим с помощью множителя Лагранжа λ. Дифференцируем функцию

$$\Phi = \sum_i \sum_j L_{ij} \frac{\mathcal{A}_i}{T} \frac{\mathcal{A}_j}{T} - 2\lambda \sum_i \frac{\mathcal{A}_i}{T}$$

по $\mathcal{A}_i/T$ и приравниваем производную нулю. Получаем

$$\frac{\partial \Phi}{\partial (\mathcal{A}_i/T)} = 2 \sum_j L_{ij} \frac{\mathcal{A}_j}{T} - 2\lambda = 0.$$

Скорость $v_i = \sum_j L_{ij} \mathcal{A}_j/T = \lambda = \text{const}$. Следовательно, искомая эквивалентность доказана.

Мы уже указывали, что для реализации стационарного состояния необходимо наличие двух шкал времени. Состояние биосферы приблизительно стационарно в течение времени, много меньшего времени охлаждения Солнца. В организме поддерживаются стационарные потоки вещества и энергии (*гомеостаз*, или, точнее, *гомеорез*, по Уоддингтону) в течение времени, много меньшего времени, протекающего от рождения до смерти.

Изложенные положения применимы к феноменологическому объяснению *деления клетки*. Баланс энтропии в клетке, представляемой сферой радиусом r, есть

$$\Delta S = S_i - S_e = \alpha \cdot {}^4/_3 \pi r^3 - \beta \cdot 4\pi r^2.$$

Производство энтропии внутри клетки пропорционально ее объему, отток энтропии пропорционален поверхности (α, $\beta > 0$ — факторы пропорциональности). Клетка растет, r увеличивается, пока не будет достигнуто стационарное состояние, при котором $\Delta S = 0$, $r = 3\beta/\alpha$. При $r > 3\beta/\alpha$ производство энтропии внутри клетки уже не компенсируется оттоком и клетка гибнет. Однако если она при этом делится, то ΔS вновь становится отрицательным. При делении сохраняется объем, но возрастает поверхность. Имеем

$$S_i = 2\alpha \cdot {}^4/_3 \pi r'^3 = \alpha \cdot {}^4/_3 \pi r^3, \quad r' = r/\sqrt[3]{2},$$

$$S_e = 2\beta \cdot 4\pi r'^2 = 8\beta \pi r^2/\sqrt[3]{4},$$

и при $r = 3\beta/\alpha$

$$\Delta S = 36\pi \frac{\beta^3}{\alpha^2}(1 - \sqrt[3]{2}) \approx -29{,}4 \frac{\beta^3}{\alpha^2}.$$

Определим теперь условия устойчивости стационарного состояния. Теорема Пригожина о минимуме производства энтропии σ дает критерий эволюции, показывая, что система необходимым образом переходит в стационарное неравновесное состояние из любого близкого к нему состояния.

Без ограничения общности рассмотрим две сопряженные химические реакции. Функция диссипации положительна:

$$\sigma_{in} = L_{11}\left(\frac{\mathcal{A}_1}{T}\right)^2 + 2L_{12}\frac{\mathcal{A}_1}{T}\frac{\mathcal{A}_2}{T} + L_{22}\left(\frac{\mathcal{A}_2}{T}\right)^2 > 0. \qquad (9.86)$$

Вычислим $\dot{\sigma}_{in}$, считая коэффициенты постоянными:

$$\frac{1}{2}\dot{\sigma}_{in} = \left(L_{11}\frac{\mathcal{A}_1}{T} + L_{12}\frac{\mathcal{A}_2}{T}\right)\frac{d(\mathcal{A}_1/T)}{dt} + \left(L_{12}\frac{\mathcal{A}_1}{T} + L_{22}\frac{\mathcal{A}_2}{T}\right)\frac{d(\mathcal{A}_2/T)}{dt} =$$

$$= v_1\frac{d(\mathcal{A}_1/T)}{dt} + v_2\frac{d(\mathcal{A}_2/T)}{dt}. \qquad (9.87)$$

В замкнутой системе $\mathcal{A}_1$ и $\mathcal{A}_2$ зависят от координат реакций ξ_1, ξ_2, а также от давления и температуры, которые будем считать постоянными. Имеем

$$\frac{1}{2}\dot{\sigma}_{in} = \frac{v_1}{T}\left(\frac{\partial\mathcal{A}_1}{\partial\xi_1}v_1 + \frac{\partial\mathcal{A}_1}{\partial\xi_2}v_2\right) + \frac{v_2}{T}\left(\frac{\partial\mathcal{A}_2}{\partial\xi_1}v_1 + \frac{\partial\mathcal{A}_2}{\partial\xi_2}v_2\right). \qquad (9.88)$$

Мы видели, что сродство $\mathcal{A}$ есть производная от свободной энергии системы по координате соответствующей реакции, взятая со знаком минус, т. е. справедливо равенство (9.50):

$$\mathcal{A}_i = -\frac{\partial G}{\partial\xi_i}.$$

Следовательно, $\partial\mathcal{A}_1/\partial\xi_2 = \partial\mathcal{A}_2/\partial\xi_1$ и мы имеем

$$\frac{1}{2}\dot{\sigma}_{in} = \frac{1}{T}\left(\frac{\partial\mathcal{A}_1}{\partial\xi_1}v_1^2 + 2\frac{\partial\mathcal{A}_1}{\partial\xi_2}v_1v_2 + \frac{\partial\mathcal{A}_2}{\partial\xi_2}v_2^2\right) < 0. \qquad (9.89)$$

Величина $\dot{\sigma}_{in}$ отрицательна, так как величины $\mathcal{A}_i$ убывают с ростом ξ_i — в равновесии $\mathcal{A}_i = 0$.

В замкнутой системе продукция энтропии может только убывать со временем. В открытой системе имеется обмен веществом с внешней средой, и полное изменение энтропии описывается выражением

$$\frac{1}{2}\dot{\sigma} = \frac{1}{2}\dot{\sigma}_{in} + \frac{1}{T}\sum_\gamma\left(v_1\frac{\partial\mathcal{A}_1}{\partial n_\gamma} + v_2\frac{\partial\mathcal{A}_2}{\partial n_\gamma}\right)\frac{d_{ex}n_\gamma}{dt}. \qquad (9.90)$$

Здесь первый член всегда отрицателен, знак второго зависит от конкретной ситуации. Внутренние необратимые процессы всегда понижают скорость продукции энтропии. Из неравенства $\dot{\sigma}_{in} < 0$ следует, что если система достигла состояния с минимумом продукции энтропии, она не может покинуть его спонтанно.

Дифференциал функции диссипации можно представить в виде

$$d\sigma = d_J\sigma + d_X\sigma = \sum_i X_i dJ_i + \sum_i J_i dX_i. \qquad (9.91)$$

В линейной области вследствие условия Онзагера $d_X\sigma = d_J\sigma = {}^1/_2 d\sigma$, т. е. $d_X\sigma$ есть полный дифференциал (именно этот дифференциал фигурирует в (9.88), где потоки v_i считаются постоянными). Следовательно,

$$\frac{d_X\sigma}{dt} = \frac{1}{2}\frac{d\sigma}{dt}.$$

В стационарном состоянии $\sigma_{in} < 0$, т. е. $d_X\sigma < 0$, $d\sigma < 0$. Соответственно вариационное условие устойчивости состоит в том, что

$$\delta\sigma = 2\delta_X\sigma \geqslant 0. \qquad (9.92)$$

Знак вариации противоположен знаку дифференциала — флуктуация может вызвать лишь избыточную продукцию энтропии. Допустим, что $J_M = 0$ в стационарном состоянии (см. с. 317). При флуктуации δX_M имеем $J_M = L_{MM}\delta X_M$, где $L_{MM} > 0$ и

$$\delta_X\sigma = J_M\delta X_M = L_{MM}(\delta X_M)^2 > 0.$$

Для химической реакции это условие имеет вид

$$T\delta_X\sigma = \sum_i v_i\delta\mathcal{A}_i > 0.$$

В стационарном состоянии

$$Td_X\sigma = \sum_i v_i^{st} d\mathcal{A}_i = 0,$$

если все $\mathcal{A}_i$ независимы. Этого всегда можно достичь образованием подходящих линейных комбинаций скоростей и значений сродства реакций. Следовательно, можно положить стационарные значения v_i^{st} равными нулю. Значит,

$$v_i = v_i^{st} + \delta v_i = \delta v_i,$$

и условие устойчивости стационарного состояния имеет вид

$$T\delta_X\sigma = \sum_i \delta v_i\delta\mathcal{A}_i > 0. \qquad (9.93)$$

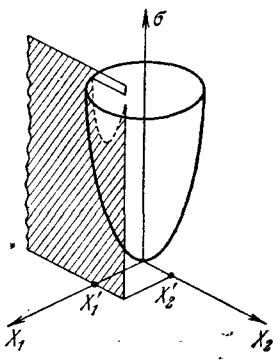


Рис. 9.3. Схема, поясняющая поведение стационарной линейной системы

Как мы видели (см., например, (9.79)), σ выражается квадратичной функцией от X. Представим это схематическим рис. 9.3 для случая двух сил, X_1 и X_2. Если при $X_1 = \text{const}$ сила X_2 может изменяться, точка, изображающая величину σ, будет двигаться по параболе, получаемой при пересечении поверхности

$\sigma(X_1, X_2)$ плоскостью $X_1 = \text{const}$, пока она не достигнет минимума σ. Если нет никаких ограничений, величина σ будет двигаться по поверхности до равновесной точки $\sigma = 0$.

Возвращение отклонившейся линейной системы в стационарное состояние, близкое к равновесному, происходит экспоненциально, без осцилляций:

$$\delta\xi = \xi(t) - \xi^{st} = (\xi(0) - \xi^{st})\exp(-t/\tau), \qquad (9.94)$$

где ξ^{st} — стационарное значение координаты реакции, τ — *время релаксации*.

§ 9.6. Сопряжение химических реакций с переносом вещества

Организм, клетка — химические машины, функционирующие в результате химических реакций и переноса вещества между клеткой и окружающей средой, а также внутри клетки. Перенос имеет определенное направление, перпендикулярное к клеточной и внутриклеточным мембранам. Поток вещества есть вектор. В то же время скорость химической реакции — скаляр. Как уже сказано (с. 312), прямое сопряжение скалярного и векторного процессов невозможно в изотропной системе в силу принципа Кюри. Невозможно оно и в анизотропных системах, имеющих центр симметрии. Однако биологические системы, в которых сопрягаются химические реакции и диффузия, а именно мембраны, построены из хиральных молекул, лишенных плоскости и центра симметрии (§ 2.7). Мембраны анизотропны. В таких системах в принципе возможно прямое сопряжение, векторные коэффициенты $L_{sv} = L_{vs}$ могут отличаться от нуля. Теория прямого сопряжения химии и диффузии в мембранах, непосредственно учитывающая их анизотропию и хиральность, пока не развита. Можно представить себе, например, перемещение неких участников реакции вдоль винтового канала в мембране, в котором расположены центры. Тогда течение реакции будет различным для веществ, поступающих с разных концов канала. К тому же результату приведет рассмотрение симметричного канала, в котором регулярно расположены асимметричные, т. е. хиральные, реакционные центры. Однако пока нет оснований утверждать, что эти эффекты значительны.

Взаимосвязь химических реакций и транспорта веществ может определяться не прямым, но *косвенным сопряжением*, возникающим вследствие условия стационарности. В стационарном состоянии возникает связь между необратимыми процессами, которые непосредственно не сопряжены. Вернемся к примеру, рассмотренному на с. 317. Наряду с веществами, участвующими в реакции

$$\rightarrow A \rightarrow \rightarrow \ldots \rightarrow F \rightarrow,$$

будем вводить в систему инертное вещество Q, в реакции не участвующее. Его транспорт сопряжен, однако, с транспортом A.

Тогда

$$T\frac{d_{ex}n_A}{dt} = L_{11}\mathcal{A}_A + L_{12}\mathcal{A}_Q, \quad T\frac{d_{ex}n_Q}{dt} = L_{12}\mathcal{A}_A + L_{22}\mathcal{A}_Q,$$
$$T\frac{d_{ex}n_F}{dt} = L_F\mathcal{A}_F, \quad Tv = L_{хим}\mathcal{A}_{хим}. \tag{9.95}$$

Последнее уравнение относится к суммарной химической реакции A → F. Из условий стационарности следует:

$$\frac{dn_A}{dt} = \frac{d_{ex}n_A}{dt} - v = 0, \quad \frac{dn_F}{dt} = \frac{d_{ex}n_F}{dt} + v = 0,$$

$$\frac{dn_Q}{dt} = \frac{d_{ex}n_Q}{dt} = 0.$$

Получаем

$$\mathcal{A}_A = \frac{Tv}{L_{11} - L_{12}^2/L_{22}}, \quad \mathcal{A}_F = -\frac{Tv}{L_F}, \quad \mathcal{A}_Q = -\frac{TvL_{12}/L_{22}}{L_{11} - L_{12}^2/L_{22}}. \tag{9.96}$$

Сродство $\mathcal{A}_Q$ инертной компоненты отлично от нуля и пропорционально скорости химической реакции, в которой вещество не участвует. Вследствие этой реакции возникает разность концентраций вещества Q внутри и вне системы:

$$c_Q^{(1)}/c_Q^{(2)} = K\exp(-\mathcal{A}_Q/RT). \tag{9.97}$$

Тем самым реализуется косвенное сопряжение транспорта инертного вещества и химической реакции.

Рассмотрим косвенное сопряжение в общем виде (Качальский и Остер). Напишем функцию диссипации для системы, в которой имеются транспорт (обобщенная сила — градиент химического потенциала) и химическая реакция:

$$T\sigma = \sum_i J_i\nabla(-\mu_i) - v\sum_i \nu_i\mu_i. \tag{9.98}$$

Условие непрерывности для i-й компоненты:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = -\nabla J_i + \nu_i v. \tag{9.99}$$

Условие стационарности, т. е. постоянства концентрации c_i, есть $\dot{c}_i = 0$, т. е.

$$\nabla J_i = \nu_i v. \tag{9.100}$$

Подставляя (9.100) в (9.98), находим

$$T\sigma = -\nabla\sum_i J_i\mu_i. \tag{9.101}$$

Проинтегрируем σ для одномерного потока вдоль оси x от $x = 0$ до $x = a$. Полная диссипация на единицу площади равна

$$\sigma_{полн} = \int_0^a \sigma\,dx = \frac{1}{T}\sum_i (J_i(0)\mu_i(0) - J_i(a)\mu_i(a)). \tag{9.102}$$

Аналогичное интегрирование ∇J_i дает (ср. (9.100))

$$\int_0^a \frac{dJ_i}{dx}\,dx = J_i(a) - J_i(0) = \nu_i \int_0^a v\,dx = \nu_i J_{\text{хим}}^{\text{полн}}. \tag{9.103}$$

Из двух последних уравнений следует

$$T\sigma_{\text{полн}} = \sum_i J_i(0)\,[\mu_i(0) - \mu_i(a)] + J_{\text{хим}}^{\text{полн}} \sum_i [-\nu_i \mu_i(a)] \tag{9.104}$$

или

$$T\sigma_{\text{полн}} = \sum_i J_i(a)\,[\mu_i(0) - \mu_i(a)] + J_{\text{хим}}^{\text{полн}} \sum_i [-\nu_i \mu_i(0)]. \tag{9.104а}$$

Суммы в последних членах правых частей выражают значения сродства реакции на границах мембраны $x = 0$ и $x = a$ для проникающих в мембрану компонентов. Переходя к феноменологическим уравнениям, напишем

$$\begin{aligned} J_i(0) &= \sum_j L_{ij}(0)\,\Delta\mu_j + L_{i,\text{хим}}(0)\,\mathscr{A}(a), \\ J_{\text{хим}}^{\text{полн}} &= \sum_i L_{\text{хим},i}(0)\,\Delta\mu_i + L_{\text{хим}}(0)\,\mathscr{A}(a), \end{aligned} \tag{9.105}$$

или

$$\begin{aligned} J_i(a) &= \sum_j L_{ij}(a)\,\Delta\mu_j + L_{i,\text{хим}}(a)\,\mathscr{A}(0), \\ J_{\text{хим}}^{\text{полн}} &= \sum_i L_{\text{хим},i}(a)\,\Delta\mu_i + L_{\text{хим}}(a)\,\mathscr{A}(0). \end{aligned} \tag{9.105а}$$

В макроскопических, т. е. в проинтегрированных, выражениях появились недиагональные коэффициенты $L_{i,\text{хим}}(0)$ и $L_{i,\text{хим}}(a)$. Симметричны ли они? В локальных, неинтегрированных выражениях недиагональных коэффициентов для химии и диффузии нет, так как система изотропна и принцип Кюри справедлив. Иными словами,

$$J_i = \sum_j l_{ij} \nabla(-\mu_j), \quad v = l_{\text{хим}}\,\mathscr{A}, \tag{9.106}$$

где l — локальные феноменологические коэффициенты. То же относится к обратным выражениям

$$\nabla(-\mu_j) = \sum_i r_{ji} J_i, \quad \mathscr{A} = r_{\text{хим}} v = l_{\text{хим}}^{-1} v. \tag{9.107}$$

Установим связь между локальными и макроскопическими коэффициентами. Применяя к первому уравнению (9.107) оператор ∇, получим

$$\nabla^2(-\mu_i) = \sum_j r_{ij} \nabla J_j.$$

Подставляя условие стационарности (9.100), находим

$$\nabla^2(-\mu_i) = \left(\sum_j \nu_j r_{ij}\right) v = \left(l_{\text{хим}} \sum_j \nu_j r_{ij}\right) \mathscr{A}.$$

Умножим обе части этого уравнения на ν_i и просуммируем по i. Так как $\mathscr{A} = -\sum_i \nu_i \mu_i$, получаем

$$\sum_i \nu_i \nabla^2(-\mu_i) = \nabla^2 \mathscr{A} = \left(l_{\text{хим}} \sum_{i,j} \nu_i \nu_j r_{ij}\right) \mathscr{A}. \tag{9.108}$$

Мы получили дифференциальное уравнение для $\mathscr{A}$. Коэффициент, стоящий

при $\mathscr{A}$, имеет размерность $см^{-2}$. Обозначим его через λ^{-2} (λ — длина релаксации). Имеем

$$\lambda^2\nabla^2\mathscr{A} = \mathscr{A}. \tag{9.108а}$$

Решение этого уравнения имеет вид

$$\mathscr{A}(x) = \frac{\mathscr{A}(a)\,\mathrm{sh}\,(x/\lambda) + \mathscr{A}(0)\,\mathrm{sh}\,[(a-x)/\lambda]}{\mathrm{sh}\,(a/\lambda)}. \tag{9.109}$$

Для перехода к макроскопическим выражениям нужно проинтегрировать локальные соотношения. Интегрирование (9.100) от 0 до x дает

$$\int_0^x \frac{dJ_i}{dx}\,dx = J_i(x) - J_i(0) = \nu_i l_{\text{хим}} \int_0^x \mathscr{A}\,dx. \tag{9.110}$$

Подставляя сюда (9.109) и интегрируя, находим

$$J_i(x) = J_i(0) + \frac{\nu_i \lambda l_{\text{хим}}}{\mathrm{sh}\,(a/\lambda)}\{\mathscr{A}(a)\,(\mathrm{ch}\,(x/\lambda) - 1) - \mathscr{A}(0)\,(\mathrm{ch}\,[(a-x)/\lambda] - \mathrm{ch}\,(a/\lambda))\}. \tag{9.111}$$

С другой стороны, согласно (9.106), левая часть этого выражения равна

$$J_i(x) = \sum_j l_{ij}\nabla(-\mu_j).$$

Подставим это выражение в (9.111) и проинтегрируем от 0 до a. Так как

$$-\int_0^a \frac{d\mu_i}{dx}\,dx = \mu_i(0) - \mu_i(a) = \Delta\mu_i$$

и

$$\mathscr{A}(a) - \mathscr{A}(0) = -\sum_i \nu_i\mu_i(a) + \sum_i \nu_i\mu_i(0) = \sum_i \nu_i\Delta\mu_i,$$

то в результате интегрирования получаем

$$J_i(0)\cdot a = \sum_j [l_{ij} + \nu_i\nu_j\lambda l_{\text{хим}}(a\,\mathrm{cth}\,(a/\lambda) - \lambda)]\,\Delta\mu_j - [\nu_i\lambda l_{\text{хим}} a\,\mathrm{th}\,(a/2\lambda)]\,\mathscr{A}(a). \tag{9.112}$$

Разделим выражение (9.112) на a и получим макроскопические феноменологические выражения. Обозначим

$$\lambda l_{\text{хим}}[\mathrm{cth}\,(a/\lambda) - \lambda/a] = \alpha, \qquad \lambda l_{\text{хим}}\,\mathrm{th}\,(a/2\lambda) = \beta.$$

Окончательно находим

$$J_i(0) = \sum_j (l_{ij}/a + \nu_i\nu_j\alpha)\,\Delta\mu_j - \nu_i\beta\mathscr{A}(a), \tag{9.113}$$

что совпадает с (9.105), причем

$$L_{ij}(0) = l_{ij}/a + \nu_i\nu_j\alpha, \qquad L_{i,\,\text{хим}}(0) = -\nu_i\beta.$$

Вычисление $J^{\text{полн}}_{\text{хим}}$ дает

$$J^{\text{полн}}_{\text{хим}} = \int_0^a J_{\text{хим}}\,dx = l_{\text{хим}}\int_0^a \mathscr{A}\,dx = \lambda l_{\text{хим}}[\mathscr{A}(a) + \mathscr{A}(0)]\,\mathrm{th}\,(a/2\lambda) = -\sum \nu_i\beta\Delta\mu_i + 2\beta\mathscr{A}(a). \tag{9.114}$$

Сравнивая (9.114) со вторым уравнением (9.105), находим

$$L_{\text{хим},\,i}(0) = -\nu_i\beta, \quad L_{\text{хим}}(0) = 2\beta. \tag{9.115}$$

Таким образом, макроскопические коэффициенты, характеризующие косвенное сопряжение диффузионных потоков и химической реакции, выражены через микроскопические коэффициенты. Соотношения симметрии Онзагера сохраняются. Отличие от нуля макроскопических коэффициентов сопряжения определяется в изотропной системе условиями стационарности.

Как мы увидим, косвенное сопряжение играет важную роль в теории мембранного транспорта (см. гл. 10 и 13). В главе 10 мы ознакомимся и с косвенным сопряжением при так называемом *облегченном транспорте*, происходящем с участием молекул-*переносчиков*.

§ 9.7. Процессы, далекие от равновесия

Живые системы характеризуются высокой упорядоченностью структуры и поведения в пространстве и времени. Мы уже отмечали кажущееся противоречие между возрастанием сложности системы в ходе ее биологического развития и вторым началом термодинамики (с. 12). Противоречие это легко снимается: живая система есть открытая система, энтропия которой может и возрастать, и убывать. Принято говорить об «антиэнтропийности» жизни. Однако эти слова никак не объясняют особенности пространственно-временного порядка открытой системы, смысл понятия «антиэнтропийность» остается неясным.

В природе мы встречаемся с двумя типами упорядоченности — со статической и с динамической упорядоченностью. В первом случае порядок реализуется в термодинамически равновесных условиях при достаточном понижении температуры, например при кристаллизации жидкости. Статическая упорядоченность возникает в результате фазового перехода, условия которого являются равновесными. С этой упорядоченностью в биологии практически не приходится встречаться — *апериодический кристалл* Шредингера (с. 12) принципиально отличен от равновесного периодического кристалла. Динамический порядок живой системы реализуется не потому, что энтропия понижается вследствие понижения температуры, а потому, что имеется отток энтропии из открытой системы в окружающую среду. Возникновение пространственно-временной структуры и в этом случае имеет характер *фазового перехода*, однако не равновесного. Исследования динамической упорядоченности, имеющие фундаментальное значение для физики и биологии, начались сравнительно недавно. Сейчас известен ряд модельных небиологических систем (в частности, химических), в которых наблюдается динамический порядок. О них рассказано в гл. 16. Здесь мы приведем пример динамического порядка, проявляющегося в излучении лазера. Атомы лазера возбуждены извне, посредством оптической накачки. Каждый атом действует подобно антенне, из-

лучая световой импульс порядка 3 м длины, причем процесс излучения длится 10^{-8} с. Испускание света атомом происходит независимо от другого атома. Однако при некотором уровне накачки возникает резкий переход к когерентному излучению очень длинных световых импульсов (до 300 000 км!) с резко возросшей интенсивностью. Лазер представляет собой открытую систему, далекую от равновесия, в которой возникает динамический порядок — самоорганизация когерентных излучателей.

Как мы увидим дальше, динамический порядок, возникновение динамических структур и их упорядоченное поведение во времени возможны лишь вдали от равновесия. Линейная неравновесная термодинамика, кратко изложенная в этой главе, справедлива лишь вблизи равновесия. Ее основные положения выражаются соотношениями (9.51) и (9.80). Первое описывает сопряжение различных кинетических процессов вследствие отличия недиагональных коэффициентов L_{ij} $(i \neq j)$ от нуля, второе есть математическое выражение теоремы Пригожина о минимуме производства энтропии в стационарном состоянии. Несомненно, что в биологической открытой системе реализуются сопряженные процессы. Поэтому общая феноменологическая теория Онзагера — Пригожина позволяет объяснить важные биологические явления. Вопрос о применимости теоремы Пригожина к биологическим системам более сложен. Как мы видели, продукция энтропии σ минимальна лишь в тех стационарных состояниях биологических систем, которые близки к равновесию. Эти системы описываются линейными соотношениями (9.51). Но в физике линейная зависимость реакций системы от воздействия, вызвавшего эту реакцию, есть всегда лишь первое приближение, справедливое для малых воздействий. В нашем случае «малость» означает малое удаление от равновесия. Для рассмотрения биологических систем и их динамической упорядоченности необходимо выйти за пределы линейной термодинамики.

Рассмотрим системы, удаленные от равновесия. Встречаются ситуации трех типов. Во-первых, предположение о локальном равновесии может быть недействительным, т. е. соотношения Онзагера $L_{ij} = L_{ji}$ не выполняются. Во-вторых, локальное равновесие может сохраняться, но свойства системы непрерывно изменяются по мере отклонения от равновесия. В этом случае система сохраняет ряд свойств линейных систем, в частности, остается справедливой теорема о минимуме продукции энтропии в стационарном состоянии. И, наконец, в третьем случае возникает динамический порядок, новые типы организации вещества в пространстве и времени, присущие только открытым, далеким от равновесия системам, именуемым *диссипативными системами*.

Очевидно, что возникновение динамического порядка определяется неустойчивостями равновесных и стационарных состояний системы. Рассмотрим соответствующие критерии устойчивости.

Если в системе нет продукции энтропии, то $d_iS = 0$ и в частном случае выделения теплоты dQ

$$dS = d_eS = dQ/T,$$

где d_eS — поток энтропии. Если $d_iS \geqslant 0$, то

$$d_iS = dS - dQ/T \geqslant 0.$$

Подставляя в это выражение закон сохранения энергии в виде

$$dQ = dE + p\,dV,$$

где E — энергия системы, получаем выражение второго начала

$$T\,d_iS = T\,dS - dE - p\,dV \geqslant 0. \tag{9.116}$$

Условие устойчивости равновесного состояния имеет вид (при постоянных p и T)

$$\delta E + p\delta V - T\delta S \geqslant 0. \tag{9.117}$$

При постоянных S и V вариация $\delta E \geqslant 0$, т. е. энергия минимальна для устойчивого равновесия. В равновесии $(\delta E)_{eq} = 0$ $(\delta^2 E)_{eq} > 0$. Напротив, для систем с постоянными E и V

$$\delta S \leqslant 0, \quad (\delta S)_{eq} = 0, \quad (\delta^2 S)_{eq} < 0, \tag{9.118}$$

т. е. энтропия максимальна в состоянии равновесия. Применительно к химическим реакциям это означает, что

$$\left(\frac{\partial \mathcal{A}}{\partial \xi}\right)_{eq} (\delta\xi)^2 < 0,$$

так как

$$\Delta S = \int \sigma\,dt = \int \frac{\mathcal{A}}{T} v\,dt = \int_{\xi_{eq}}^{\xi} \frac{\mathcal{A}}{T}\,d\xi.$$

Следовательно, условие

$$\left(\frac{\partial \mathcal{A}}{\partial \xi}\right)_{eq} < 0$$

получается из (9.118). Общий критерий устойчивости для совокупности химических реакций можно представить в виде

$$\sum_{i,j} \left(\frac{\partial \mathcal{A}_i}{\partial \xi_j}\right)_{eq} \delta\xi_i \delta\xi_j < 0. \tag{9.119}$$

Это термодинамическое условие эквивалентно кинетическому. При $t \to \infty$ вариация $\delta\xi \to 0$. Вблизи равновесия флуктуации $\delta\xi$ удовлетворяют линейным уравнениям

$$\frac{d\,(\delta\xi_i)}{dt} = \sum_j a_{ij}\delta\xi_j \tag{9.120}$$

с решениями

$$\delta\xi_i = (\delta\xi_i)_{t=0} \exp(\lambda t);$$

причем все собственные значения λ, являющиеся корнями уравнения

$$\|a_{ij} - \lambda\delta_{ij}\| = 0,$$

вещественны и отрицательны, $\lambda < 0$, т. е. флуктуации монотонно ватухают (ср. с. 322).

Вблизи равновесия сродство выражается формулой

$$\mathscr{A}_i \approx \sum_j \left(\frac{\partial \mathscr{A}_i}{\partial \xi_j}\right)_{\text{eq}} \delta\xi_j,$$

так как $(\mathscr{A})_{\text{eq}} = 0$. Функция диссипации равна

$$\sigma = \sum_i v_i \frac{\mathscr{A}_i}{T} \equiv \sum_i \frac{d\xi_i}{dt}\frac{\mathscr{A}_i}{T} = \sum_i \frac{d(\delta\xi_i)}{dt}\frac{\mathscr{A}_i}{T} \geqslant 0.$$

Подставляя в это выражение значения $\mathscr{A}_i$ и $\delta\xi_i$, получаем для каждого значения λ

$$\lambda \sum_{i,j} \left(\frac{\partial \mathscr{A}_i}{\partial \xi_j}\right)_{\text{eq}} \delta\xi_i \delta\xi_j > 0,$$

что совпадает с (9.119), так как $\lambda < 0$.

Условие устойчивости для неравновесного, но стационарного состояния, близкого к равновесному, уже рассмотрено выше. Для химических реакций оно имеет вид (9.93)

$$\sum_i \delta v_i \delta \mathscr{A}_i \geqslant 0.$$

Рассмотрим химическую реакцию

$$X + Y \rightarrow C + D.$$

Будем одинаково обозначать реагенты и их концентрации. Имеем

$$\mathscr{A} \sim \ln \frac{XY}{CD}, \quad v \sim XY.$$

Флуктуация концентрации X вблизи стационарного состояния приводит к избыточной продукции энтропии, пропорциональной

$$\delta v\, \delta \mathscr{A} \sim \frac{Y}{X}(\delta X)^2 > 0.$$

Условие устойчивости соблюдается.

Рассмотрим теперь *автокаталитическую реакцию*, текущую с увеличением концентрации исходного вещества

$$X + Y \rightarrow 2X.$$

По-прежнему $v \sim XY$, но

$$\mathscr{A} \sim \ln \frac{XY}{X^2} = \ln \frac{Y}{X}$$

и

$$\delta v\, \delta \mathscr{A} \sim -\frac{Y}{X}(\delta X)^2 < 0.$$

Условие устойчивости не соблюдается. Однако оно сохраняется вблизи равновесия. Для того чтобы найти условия равновесия, необходимо учесть и обратную реакцию

$$X + Y \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} 2X.$$

Тогда имеем

$$v = k_1XY - k_{-1}X^2, \quad \delta v = k_1Y\delta X - 2k_{-1}X\delta X.$$

В равновесии $k_1Y = k_{-1}X$, и мы получаем

$$\delta v = -k_{-1}X\,\delta X \quad \text{и} \quad \delta v\,\delta \mathcal{A} \sim (\delta X)^2 > 0.$$

Таким образом, вдали от равновесия действительно могут возникать неустойчивые состояния диссипативной системы. Появление неустойчивости в некотором исходном состоянии означает переход системы в новый режим, которому может отвечать иной тип поведения. Допустим, что имеется нелинейная система химических реакций, в ходе которых исходные вещества A превращаются в конечные продукты F. Систему можно охарактеризовать некоторым параметром R, зависящим от общего сродства, т. е. от отношения концентраций A и F и от константы равновесия. На рис. 9.4 стационарная концентрация промежуточного вещества представлена как функция R. При малых отклонениях от равновесия $|R - R_{eq}|$ система перемещается плавно вдоль *термодинамической* (*статической*) *ветви* AB на рис. 9.4. Все стационарные состояния на этой ветви устойчивы и согласуются с теоремой о минимумах производства энтропии. Однако на достаточно большом удалении от равновесия, при некотором пороговом значении R_c избыточная продукция энтропии, равная

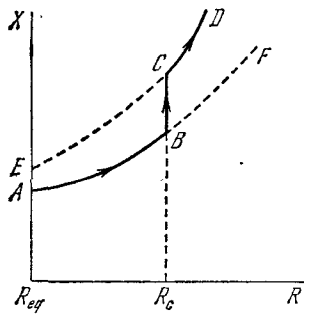


Рис. 9.4. Зависимость стационарной концентрации промежуточного вещества от параметра R

$$\delta_X\sigma = \frac{1}{T}\sum_i \delta v_i \delta \mathcal{A}_i,$$

может стать отрицательной. При этом значении R_c возникает неустойчивость, и система переходит на новую *кинетическую* (*динамическую*) *ветвь* CD, состояния на которой вновь устойчивы. Области неустойчивых состояний на рис. 9.4 — это EC и BF. На кинетической ветви могут возникать организация системы во времени (скажем, незатухающие колебания), организация в пространстве и новые множественные стационарные состояния.

При достижении порога R_c происходит переход типа фазового вследствие усиления флуктуаций, достигающих макроскопическо-

го уровня. Становятся устойчивыми новый режим, новая структура. Этот эффект, конечно, совместим с граничными условиями, наложенными на систему. Именно таково поведение лазера. Другой пример — *нестабильность Бенара*. Слой вязкой жидкости, подогреваемой снизу, переходит при критическом значении градиента температуры в состояние внутреннего конвекционного движения, образуя упорядоченные кооперативные структуры (рис. 9.5). Эффект непосредственно связан с нелинейностью уравнений гидродинамики. Сходным образом нелинейные, автокаталитические химические процессы приводят в области, расположенной за термодинамическим порогом, к возникновению пространственно-временных диссипативных структур (гл. 16). Порядок в равновесной системе возникает в соответствии с условием минимума свободной энергии, в диссипативной системе — вследствие возрастания флуктуаций до макроскопического уровня.

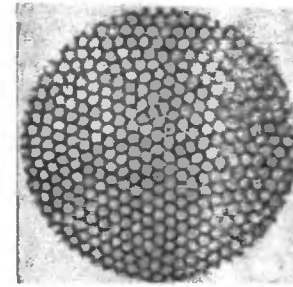


Рис. 9.5. Структура Бенара

Область физики, изучающая диссипативные системы и их самоорганизацию, именуется *синергетикой*. В этой области мы выходим за пределы термодинамики и вынуждены обратиться к конкретным кинетическим моделям (гл. 15—17). Как мы увидим, эти модели оказываются эффективными и при изучении биологического развития — *филогенеза* и *онтогенеза* (гл. 17).

Обращение к диссипативным системам непосредственно связано с расширением теории информации. Оказывается необходимым исследовать не только количество информации, ее передачу и перекодировку, но и рецепцию информации, возможную лишь вне равновесия, при наличии неустойчивости.

Глава 10

ФИЗИКА МЕМБРАН

§ 10.1. Мембраны клетки

Неклеточные формы жизни не существуют на Земле. Вирусы и бактериофаги не могут рассматриваться как самостоятельные живые системы — из всех функций живой клетки они обладают лишь способностью передавать генетическую программу. Напротив, основные характеристики жизни присущи как одноклеточным организмам, так и подавляющему большинству типов специализированных клеток многоклеточных. Строение и поведение отдельных клеток настолько сложно, что оказывается возможным формулировать проблемы поведения на клеточном уровне, проблемы *цитоэтологии* (Александров, 1970).

Построение надмолекулярной биологии начинается с изучения живой клетки. Биофизика клетки стремится провести рассмотрение клетки, пользуясь экспериментальными и теоретическими моделями, к которым применимы физические подходы.

Важнейшие физические и физико-химические функции клетки состоят в химическом метаболизме и биосинтезе, в биоэнергетических процессах запасания энергии и ее преобразования при реализации электро- и механохимических процессов и регулируемого транспорта молекул и ионов. Как мы видели (§ 2.6), запасание энергии происходит главным образом в форме АТФ — химическая энергия АТФ трансформируется в химическую, электрическую, осмотическую и механическую работу. Биосинтетическая и биоэнергетическая функции неразрывно связаны; они реализуются лишь в открытой неравновесной системе. Соответственно эти функции сопряжены с транспортом вещества из окружающей среды в клетку и из клетки в окружающую среду.

Сочетание транспорта вещества с сохранением и автономностью внутреннего устройства клетки осуществляется единственным возможным способом — для выполнения своих функций клетка как целое отделена от внешней среды полупроницаемой перегородкой. Каждая клетка окружена плазматической мембраной. Появление клеточной мембраны, по-видимому, было важным этапом в возникновении жизни — *компартментация*, отделение внутриклеточного пространства от внешнего мира, определяла решительное ускорение добиологической и биологической эволюции (см. гл. 17).

С другой стороны, тонкая регуляция внутриклеточных процессов осуществляется на основе пространственного разделения органоидов клетки. Внутриклеточные мембраны служат для компартментации внутреннего содержимого клетки.

Биологические мембраны — надмолекулярные системы, протяженность которых в двух измерениях значительно превосходит их толщину, имеющую порядок 10 нм. Однако все механизмы, ответственные за биологическую функциональность мембраны, локализованы именно в ее толще.

Мембраны не являются пассивными полупроницаемыми оболочками, но принимают прямое и очень важное участие во всех функциях клетки. Мембраны обеспечивают *активный транспорт* вещества, идущий в направлении, противоположном градиенту химического или электрохимического потенциала. В мембранах локализованы основные биоэнергетические процессы — *окислительное фосфорилирование* и *фотосинтез*. АТФ синтезируется в мембранах *митохондрий*, в *тилакоидных мембранах хлоропластов* зеленых растений. Есть основания думать о связи между рибосомами, на которых синтезируется белок, и мембранной системой *эндоплазматического ретикулума*. Репликация ДНК и хромосом, по-видимому, происходит с участием мембран.

К важнейшим биоэнергетическим процессам относятся явления биоэлектрические — генерация *биопотенциалов*. Распространение нервного импульса есть мембранный процесс. Рецепция — механическая, акустическая, обонятельная, вкусовая, зрительная — происходит с непременным участием мембран.

Из сказанного следует, что физика мембран — одна из центральных областей биофизики. Мембранная физика и биология имеют фундаментальное значение и для теоретической науки, и для ее приложений в медицине и фармакологии.

Перечислим основные проблемы физики мембран.

1. Строение мембран, динамические свойства мембранной структуры, определяющие ее функциональность (§ 10.2 и 10.3).
2. Пассивный и активный мембранный транспорт (§ 10.4—10.6).
3. Свойства возбудимых мембран (гл. 11 и 12).
4. Биоэнергетика мембран (гл. 12—14).
5. Физика процессов рецепции (§ 11.7, 12.6, 14.6).

В заключение этого параграфа в табл. 10.1 представлены важнейшие события в биологических мембранах разного типа.

Таблица 10.1. **События в мембранах (Витт)**

Фотосинтез	$\hbar\omega$	$\Delta\psi$	t	e	АТФ (+ и —)
Дыхание	—	$\Delta\psi$	t	e	АТФ (+ и —)
Зрение	$\hbar\omega$	$\Delta\psi$	t	—	АТФ (—)
Нервы	—	$\Delta\psi$	t	—	АТФ (—)
Мышцы	—	$\Delta\psi$	t	—	АТФ (—)

Квант $\hbar\omega$ указывает на явления, связанные со световыми квантами, $\Delta\varphi$ — изменение электрического потенциала, i — возникновение электрического (ионного) тока, e — транспорт электронов, АТФ (+) — синтез АТФ, АТФ (−) — распад АТФ.

§ 10.2. Структура мембран

Биологическая мембрана есть динамическая организованная система; необходимо исследовать как ее устройство, так и динамику ее поведения.

Мембраны состоят в основном из липидов и белков. В клетках млекопитающих содержатся и небольшие количества углеводов, связанных с белками (гликопротеиды) или с липидами. Во внутренних мембранах присутствуют в основном фосфолипиды, в плазматических содержатся и нейтральные липиды. Так, в мембранах эритроцитов 30% липидов составляет *холестерин*.

Выделение из мембран индивидуальных компонентов производится с помощью *детергентов* (например, додецилсульфата натрия), солюбилизирующих нерастворимые вещества, и разделения полученных белков путем электрофореза в полиакриламидном геле.

В большинстве случаев мембраны весьма гетерогенны. Фосфолипиды и липиды представлены в них целыми семействами. Так, в мембранах эритроцитов человека содержится не менее 20 видов лецитина. Липиды построены из полярной «головы» и двух длинных неполярных углеводородных «хвостов», обладающих гидрофобными свойствами.

Белки мембран также разнообразны. Около трети белков мембраны эритроцита образует спектрин, состоящий из двух компонентов с м. м. 255 000 и 220 000. Вторая треть — *ряд белков* с м. м. около 90 000 и третья — белки с м. м. 9 000—15 000. Существуют и мембраны более простого состава — внутренние мембраны палочек сетчатки содержат лишь один белок — *родопсин* (см. § 14.7).

Еще в 1935 г. Даниэлли и Давсон предложили так называемую *унитарную модель* биологической мембраны. Унитарная мембрана состоит из двойного липидного слоя, причем гидрофобные «хвосты» липидов обращены внутрь мембраны, а их «головы» выходят на поверхность, где они взаимодействуют с внешними мономолекулярными белковыми слоями (рис. 10.1).

Основным источником информации о строении клеток и клеточных мембран служит электронная микроскопия. Для получения снимков препараты оттеняются OsO_4, $KMnO_4$ и т. п. Химия происходящих при этом процессов еще недостаточно изучена; неясно также, что происходит при выделении мембран и подготовке препаратов. Здесь не исключены артефакты. Тем не менее основной принцип построения унитарной мембраны — двуслойное расположение липидов — правилен. Это доказывается и рентгенографическими данными. Что касается белков, то их рас-

положение отличается от предполагаемого в симметричной унитарной модели, согласно которой мембранные белки имеют гидрофильные поверхности, взаимодействующие с полярными «головами» липидов. Были проведены исследования выделенных мембранных белков и мембран косвенными методами — воздействием

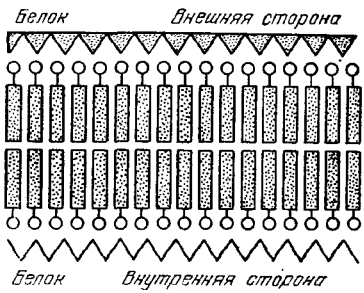


Рис. 10.1. Унитарная модель биологической мембраны. Кружки — полярные «головы», прямоугольники — неполярные «хвосты» липидов

на них протеолитических ферментов и включением в мембранные белки различных меток. Оказалось, что белки мембран можно разделить на два класса. Одни из них связываются только поверхностями мембраны; подобно глобулярным белкам, функционирующим в водном окружении, они имеют гидрофильную поверхность. Белки второго класса способны проникать в мембрану, взаимодействуя с гидрофобными «хвостами» липидов. Эти белки нерастворимы в воде, их поверхности гидрофобны. Исследования мембран методами инфракрасной спектроскопии, спектрополяриметрии, ЯМР и т. д. указывают на разнообразие белковых структур и на межбелковые взаимодействия, не учитываемые в унитарной модели. Установлено, что белки распределены в мембранах асимметрично (Бергельсон, 1970).

Важные результаты получены *методом скалывания* в замороженном состоянии (freeze etching). Мембраны быстро замораживают при температуре жидкого азота и дробят в вакууме. Лед сублимируется, образец оттеняют, реплицируют платиной и углеродом и исследуют под электронным микроскопом. Выяснилось, что излом проходит вдоль внутренней гидрофобной области мембраны эритроцита. При этом обнаружились глобулярные частицы диаметром до 7.5 нм. Эти частицы — белки.

Унитарная модель не раз модифицировалась. В настоящее время наиболее правдоподобной представляется *мозаичная модель* мембраны, показанная на рис. 10.2. Билипидный слой фигурирует и в этой модели. Действительно, *искусственные липидные мембраны*, имеющие двуслойное строение, оказались во многих отношениях сходными с биологическими мембранами. Искусственные мембраны получаются при контакте смеси фосфолипидов и нейтральных липидов, растворенных в органических растворителях, с водой. При этом можно получить «черные» мембраны, т. е. тонкие слои, лишенные интерференционных цве-

тов, имеющие толщину менее 10 нм. Установлено, что эти мембраны имеют указанное двуслойное строение. В табл. 10.2 сопоставлены свойства искусственных двуслойных липидных и биологических мембран.

Искусственные мембраны лишены метаболической активности и не обладают столь высокой селективностью, как биологические

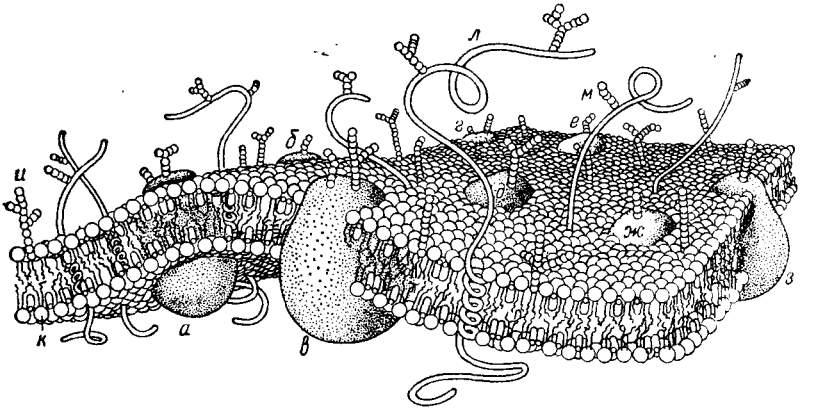


Рис. 10.2. Современная схема строения клеточной мембраны: *а — з* — глобулярные белки, *и* — гликолипид, *к* — фосфолипид, *л* — α-спиральный белок, *м* — боковая цепь олигосахарида

мембраны. Вместе с тем они моделируют важные свойства биомембран, позволяют изучать и транспорт вещества, и возбудимость.

Установлено, что в системах липиды — вода образуются жидкокристаллические структуры сложного и разнообразного строе-

Таблица 10.2. Сравнение свойств двуслойных липидных и биологических мембран

Свойства	Биологические мембраны при 25 °С	Двуслойные мембраны при 36 °С
Толщина, нм	6—10	6,7—7,5
Емкость, пФ/мм^2	0,5—1,3	0,38—1,0
Сопротивление, Ом·см^2	10^2—10^5	10^6—10^9
Напряжение пробоя, мВ	100	150—200
Поверхностное натяжение, Н/см^2	$(0{,}03 \div 1{,}0) \cdot 10^{-5}$	$(0{,}5 \div 2{,}0) \cdot 10^{-5}$
Проницаемость для воды, мкм/с	0,37—400	31,7
Энергия активации для транспорта воды, кДж/моль	40,3	53,3

ния, с дальним порядком. Эти системы представляют самостоятельный научный интерес. Есть основания думать, что многофазность липидных систем имеет прямое отношение к функциям биологических мембран (см. далее).

§ 10.3. Конформационные свойства мембран

Рассмотрим динамические свойства мембран. Ряд фактов свидетельствует о высокой подвижности билипидного слоя. Липиды в мембране ведут себя подобно *жидким кристаллам*. Именно в жидком кристалле реализуется сочетание высокой упорядоченности с текучестью и лабильностью. Это сочетание обеспечивает выполнение мембранами их важных функций.

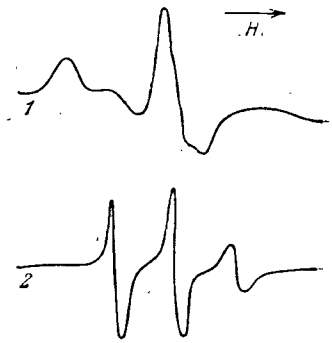


Рис. 10.3. Спектры ЭПР спин-меченой молекулы липида в мембране: *1* — 77 К, *2* — 300 К

Жидкокристаллические (жидкостные) свойства мембран определяются тем, что липиды в них находятся при физиологической температуре в расплавленном состоянии. Температура плавления углеводорода тем ниже, чем больше двойных связей он содержит (этим определяется различие между животными и растительными маслами). Липиды, содержащие в углеводородных цепях двойные связи, плавятся при температурах ниже физиологических. В плазматических мембранах млекопитающих доля таких липидов велика.

Жидкостные свойства мембран доказываются многими фактами. Подвижность мембранной структуры обнаруживается с помощью парамагнитных и флуоресцентных меток, а также методом ЯМР. На рис. 10.3 показан спектр ЭПР мембраны, меченной нитроксильными метками, присоединенными к липидным «хвостам». При низкой температуре липид заморожен, при высокой спектр обостряется и становится богаче, так как липид расплавлен и нитроксил приобретает быстрое анизотропное движение.

Особенно детально изучены жидкокристаллические свойства фоторецепторных мембран, содержащих белок родопсин (§ 14.7). Одна молекула родопсина в мембране приходится на 60—90 молекул липидов, из которых 80% содержат ненасыщенную жирную кислоту. Методом вспышечной фотометрии установлено, что молекула родопсина быстро вращается вокруг оси, перпендикулярной к плоскости мембраны. Время такой вращательной диффузии 20 мкс при 20 °С. Изучение выцветания родопсина на свету методом микроспектрофотометрии показало, что в мембране происходит трансляционная латеральная диффузия родопсина. Коэффициент диффузии равен $(3.5 \pm 1,5) \cdot 10^{-9}$ см$^2 \cdot$ с$^{-1}$, что соответствует вязкости от 0,1 до 0,4 П. Близкое значение имеет вязкость мембран клеток млекопитающих, определенная по трансляционной диффузии, и мембран митохондрий и нервных аксонов. Таким образом, вязкость мембран на два или три порядка выше вязкости воды и соответствует вязкости растительного масла. Известны и более вязкие мембраны.

Устройство мембраны, показанное на рис. 10.2, таково, что белки как бы плавают в «липидном море». Их молекулы погружены с двух сторон мембраны на разную глубину в двойной слой подвижных углеводородных «хвостов» липидов. Имеются белки, проходящие через всю мембрану. Значительная часть поверхности мембраны свободна от белков: так, белки занимают 70% поверхности мембраны эритроцита и 80% поверхности мембраны микросомы. Транспорт малых ионов и молекул происходит по *каналам* в мембранах. В устройстве и функционировании каналов особенно существенна роль белков. Природа каналов — важная проблема физики мембран (см. § 11.4).

Ряд фактов свидетельствует о конформационных переходах в мембранах. Структурные изменения обнаруживаются при помощи флуоресцентных и парамагнитных меток, при измерении двойного лучепреломления и рассеяния света, методом кругового дихроизма. В мембранах наблюдаются фазовые переходы — плавление липидов. Такой переход происходит вблизи 0 °С при нагревании мембран митохондрий и микросом от −40 °С. С помощью спин-меток в суспензии плазматических мембран, выделенных из фибробластов мыши, найдены температуры латерального разделения фаз в липидах. Для внешнего монослоя липидов такие переходы наблюдаются при 15 и 31 °С, для внутреннего — при 21 и 37 °С.

Подвижность мембранных липидов и фазовые переходы в них определяются их конформационными свойствами. Плавление липидов происходит путем поворотной изомеризации углеводородных цепей — это конформационное плавление. Насыщенные углеводороды, парафины, кристаллизуются в форме сплошных *транс*-ротамеров (ср. с. 65). При плавлении наряду с *транс-* появляются свернутые, или *гош-*, ротамеры. В жидких парафинах их доля составляет около 10%. Это относится и к углеводородным «хвостам» в липидах.

На рис. 10.4 показаны изменения с температурой теплоемкости и энтальпии раствора липида — дипальмитоил-α-лецитина. Наблюдаются два фазовых перехода — при 34 °С и особенно резкий при 41 °С. Рентгенограмма при температуре ниже перехода содержит резкие дифракционные кольца, отвечающие расстоянию между цепями 0,48 нм. При температуре выше температуры перехода наблюдается диффузное кольцо, отвечающее межцепному расстоянию 0,53 нм.

Построена статистическая механика двуслойных фосфолипидных мембран, учитывающая ротамеризацию и межцепные стерические ограничения. Если принять разность энергий ротамеров $\Delta E \approx 2{,}5$ кДж/моль (ср. с. 66), получаются согласные с опытом изменения энтальпии и энтропии при плавлении двуслойного липида.

Трейбле (1971) предложил теорию транспорта молекул через липидную мембрану, основанную на тех же представлениях о ротамеризации углеводородных цепей. Свернутые (*гош-*) рота-

меры трактуются как подвижные структурные дефекты — «*кинки*», определяющие наличие свободных объемов в углеводородной фазе мембраны. Коэффициент диффузии «кинков» оценивается в 10^{-5} см$^2 \cdot$ с$^{-1}$ — это быстрая диффузия. Транспорт малых молекул происходит в результате их попадания в свободные объемы

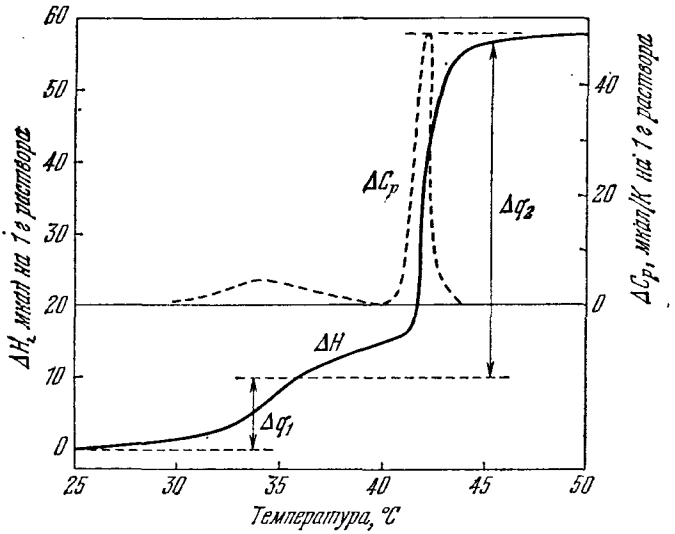


Рис. 10.4. Температурная зависимость энтальпии и теплоемкости раствора дипальмитоил-α-лецитина; Δq_1, Δq_2 — теплоты фазовых переходов

и миграции вместе с ними. Эта идея дает модель «кинетических каналов» в мембране и позволяет вычислить ее проницаемость для воды в согласии с опытом.

Конформационные изменения играют важную роль во взаимодействиях мембран с различными лигандами, что существенно для физиологии и фармакологии.

Во многих случаях реакции клеточных мембран на присоединение специфических лигандов имеют кооперативный характер. Кривые ответов мембраны и клетки на возрастающую концентрацию лиганда зачастую имеют перегибы (ср. с. 199).

Так называемые колициногенные штаммы бактерий *Escherichia coli* продуцируют макромолекулярные антибиотики — *колицины*, способные убивать бактерии других, «чувствительных» штаммов *E. coli*. При этом число молекул колицинов, нужное для убийства одной бактерии, может быть очень малым, оно может даже равняться единице. По-видимому, мембрана чувствительной клетки обладает усилительными свойствами — рецепция одной молекулы служит *триггером*, вызывая макроскопические события в масштабе клетки.

В принципе сходные триггерные процессы, надо думать, реализуются в мембранах рецепторных клеток (см. § 11.7).

Установлено, что многие лекарственные вещества влияют на конформации мембран и мембранных липидов. Шанжё и соавторы рассматривали мембрану как упорядоченную кооперативную систему, построенную из взаимодействующих субъединиц. В этих работах триггерные свойства мембраны трактуются на основе теории, аналогичной теории косвенной кооперативности ферментов, развитой Моно, Уайменом и Шанжё (см. § 6.7). Каждая субъединица имеет рецепторный центр для данного специфического лиганда, сродство к которому меняется при изменении ее конформации. В упорядоченной «решетке» мембраны субъединицы (протомеры) взаимодействуют со своими соседями, чем и определяются кооперативные свойства. В зависимости от активности лиганда и энергии взаимодействия протомеров ответ мембраны на присоединение лиганда может быть постепенным или S-образным, становясь в пределе переходом «все или ничего» — фазовым переходом. Формальная модель описывает действие колицинов, дает качественное объяснение ряду фактов, в частности, тому, что различные родственные лекарственные вещества вызывают различные максимальные ответы мембраны. Первичное действие многих лекарств локализовано в мембранах и имеет кооперативный характер. Многие лекарства действуют в очень малых концентрациях (вплоть до 10^{-11} М) и обладают высокой специфичностью. Воздействие лекарства на мембранный рецептор определяется молекулярным узнаванием, но о природе этих рецепторов мы еще мало знаем (см. § 11.7).

Главная трудность при построении молекулярной теории мембранного транспорта и рецепции состоит в анализе динамического взаимодействия белков и липидов. Мембранные рецепторы — по-видимому, белки (родопсин в фоторецепторах),— связавшись с лигандом, меняют свою конформацию, что приводит к изменению глубины погружения и подвижности белков в «липидном море». Причина кооперативности может лежать во взаимодействии «плавающих» белков при их столкновениях. Динамическая мозаичная модель может послужить основой молекулярной физики мембран.

Можно думать, что свойства мембран во многом определяются электронно-конформационными взаимодействиями (ЭКВ, см. § 6.6, 13.4). Локальный сдвиг электронной плотности, возникающий при взаимодействии рецептора мембраны с лигандом, влечет за собой конформационные перестройки биологических молекул. Перенос через мембрану электронов и ионов можно трактовать как распространение *конформонов* — условных квазичастиц, состоящих из носителей электронного заряда, или сдвига электронной плотности, и конформационных смещений окружающей среды (см. с. 198, 439).

§ 10.4. Пассивный мембранный транспорт

Рассмотрение мембранного транспорта естественно начать с термодинамики, не касаясь молекулярной структуры мембраны и механизма транспорта. Термодинамика не столько объясняет физические явления, сколько организует наши знания, устанавливая связь между физическими явлениями и их зависимость от параметров системы.

В данном случае термодинамика выявляет зависимость транспортных потоков от усредненных характеристик растворов и мембраны.

Рассмотрим простейшую модель — гомогенную мембрану, соприкасающуюся с двумя растворами (рис. 10.5). Функцию диссипации внутри элемента dx мембраны можно записать в виде

$$T\sigma = \sum_i J_i \nabla (-\mu_i), \qquad (10.1)$$

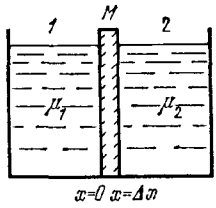


Рис. 10.5. К рассмотрению мембранного транспорта

где J_j — векторный поток i-го вещества сквозь мембрану, μ_i — химический потенциал. Проинтегрировав это выражение по толщине мембраны, имеем

$$\Psi = \int_0^{\Delta x} \sigma T\, dx = \sum_i J_i [\mu_i(0) - \mu_i(\Delta x)] = \sum_i J_i \Delta\mu_i. \qquad (10.2)$$

Если имеется одно растворенное вещество (s) и один растворитель (вода, w), то

$$\Psi = J_s\Delta\mu_s + J_w\Delta\mu_w. \qquad (10.3)$$

Расчет показывает, что эта проинтегрированная функция диссипации может быть переписана в виде

$$\Psi = J_v\Delta p + J_D\Delta\pi, \qquad (10.4)$$

где Δp — разность давлений по обе стороны мембраны, $\Delta\pi$ — разность осмотических давлений, J_v — полный объемный поток

$$J_v = J_s V_s + J_w V_w; \qquad (10.5)$$

V_s и V_w — парциальные молярные объемы, J_D — поток растворенного вещества относительно воды:

$$J_D \approx v_s - v_w; \qquad (10.6)$$

v_s и v_w — скорости переноса через мембрану. При большом избытке растворителя

$$J_v \approx v_w. \qquad (10.7)$$

Таким образом, мы перешли к обобщенным потокам J_v, J_D и к обобщенным силам Δp, $\Delta\pi$. Вблизи равновесия имеем (см. § 9.3)

$$J_v = L_p\Delta p + L_{pD}\Delta\pi, \quad J_D = L_{pD}\Delta p + L_D\Delta\pi. \qquad (10.8)$$

Потоки J_v, J_D сопряжены. Коэффициент L_p характеризует *механическую фильтрационную емкость* мембраны, т. е. скорость жидкости, приходящуюся на единицу разности давлений; L_D выражает скорость жидкости на единицу разности осмотических давлений; $L_{pD} = (J_v)_{\Delta p=0}/\Delta\pi$ — *коэффициент осмотического потока.* Для идеальной полупроницаемой мембраны, не пропускающей растворенное вещество, $J_s = 0$ и $J_v = -J_D$. Отсюда следует

$$(L_p + L_{pD})\Delta p + (L_{pD} + L_D)\Delta\pi = 0$$

и

$$-L_{pD} = L_p = L_D, \quad \Delta\pi = \Delta p.$$

Для неидеальной мембраны мера ее *селективности*

$$\varkappa = -\frac{L_{pD}}{L_p} = -\left(\frac{J_D}{J_v}\right)_{\Delta\pi=0} = \left(\frac{v_w - v_s}{v_w}\right) < 1 \qquad (10.9)$$

или

$$\varkappa = \left(\frac{\Delta p}{\Delta\pi}\right)_{J_v=0}; \qquad (10.10)$$

$\varkappa$ называется *коэффициентом отражения*. Для мембраны эритроцита человека $\varkappa = 0{,}62$ по отношению к мочевине.

Феноменологические коэффициенты L_p, L_D и L_{pD} могут быть выражены через коэффициенты трения воды и растворенного вещества о мембрану и растворенного вещества о воду.

Если растворенное вещество состоит из заряженных ионов (для биологии особенно важны ионы K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}), то вместо химического потенциала нужно рассматривать *электрохимический потенциал*

$$\tilde{\mu}_i = \mu_i + z_i\mathcal{F}\psi, \qquad (10.11)$$

где ψ — электрический потенциал мембраны, z_i — валентность заряженной частицы, $\mathcal{F}$ — число Фарадея. При равновесии двух растворов, 1 и 2, разделенных мембраной, их электрохимические потенциалы равны

$$\tilde{\mu}_i^{(1)} = \tilde{\mu}_i^{(2)} \qquad (10.12)$$

или

$$\Delta\mu_i = RT \ln \frac{a_i^{(1)}}{a_i^{(2)}} = -z_i\mathcal{F}\Delta\psi, \qquad (10.13)$$

где $a_i^{(1)}$, $a_i^{(2)}$ — активности, заменяемые в случае идеальных растворов концентрациями $c_i^{(1)}$, $c_i^{(2)}$.

Феноменологическая неравновесная термодинамика для *пассивного ионного транспорта* строится по аналогии с описанием транспорта нейтральных молекул. Феноменологические коэффициенты также выражаются через коэффициенты трения. Ситуация здесь усложнена, так как число этих коэффициентов велико — для раствора NaCl в воде их шесть. Расчеты упрощаются, если мембрана сильно заряжена, и поэтому концентрация фиксированных противоионов в мембране много больше концентрации нейтральной соли.

Неравновесная термодинамика дает физически осмысленное описание пассивного транспорта. Определяются кинетические характеристики мембраны (например, $\varkappa$), которые можно измерить на опыте. Мы видим, что трактовка проницаемости мембран требует изучения неравновесных потоков вещества. Динамика транспорта связывается со свойствами мембраны. Установленная на опыте линейная зависимость потоков от обобщенных сил (градиентов μ и $\tilde{\mu}$) для ряда пассивных искусственных и биоло-

гических мембран означает близость к равновесию рассматриваемых сопряженных процессов.

Обратимся теперь к молекулярной картине.

Живые клетки характеризуются тем, что внутри них концентрация ионов K^+ может быть в 10—20 раз выше, чем во внешней среде. Для ионов Na^+ наблюдаются градиенты того же порядка, но противоположного направления. Опыты с мечеными

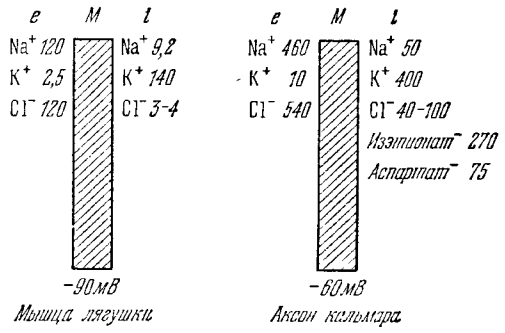


Рис. 10.6. Концентрация ионов (ммоль/л) и разности потенциалов между двумя сторонами клеточной мембраны

атомами показывают, что ионы цитоплазмы обмениваются с ионами внешней среды, т. е. клеточная мембрана проницаема для K^+ и Na^+. С наличием градиентов концентраций ионов связана наблюдаемая на опыте разность потенциалов между цитоплазмой и окружающей средой порядка 50—70 мВ. На рис. 10.6 показаны эти соотношения для мышцы лягушки и аксона кальмара.

Почему Na^+ изгоняется из клетки, а K^+ в ней остается в избыточной концентрации? Это вопрос эволюционный. Первые клетки возникали, по-видимому, в морской воде (см. § 17.1) и состав межклеточной среды, например плазмы крови, близок к составу морской воды. Для создания электрохимического потенциала на клеточной мембране, необходимого для ряда биологических функций за счет избытка Na^+ внутри клетки потребовались бы концентрации Na^+ в клетке порядка нескольких молей на 1 л. Наоборот, количество K^+ в среде, в морской воде, настолько мало, что необходимый потенциал получается при внутриклеточных концентрациях, на порядок меньших.

Опыты показывают, что в аксоплазме и K^+, и Na^+ движутся практически свободно. Тем самым градиенты их концентраций определяются не спецификой цитоплазмы, а особыми свойствами мембраны. Потенциал покоя, т. е. разность потенциалов для невозбужденной мембраны, характеризует некоторый неравновесный стационарный процесс.

Рассмотрим сначала ионное равновесие между растворами, разделенными мембраной. Скажем, для раствора NaCl имеем

$$\mu^i_{Na} + \mu^i_{Cl} = \mu^e_{Na} + \mu^e_{Cl}$$

(i — внутренняя, e — внешняя сторона мембраны) или

$$\Delta\mu_{Na} = \mu^e_{Na} - \mu^i_{Na} = -(\mu^e_{Cl} - \mu^i_{Cl}) = -\Delta\mu_{Cl}.$$

Так как $\Delta\mu$ логарифмически зависит от отношения активностей (ср. (10.13)), то

$$a^i_{Na}/a^e_{Na} = a^e_{Cl}/a^i_{Cl}. \qquad (10.14)$$

Это *доннановское равновесие*. Отношение активностей можно приближенно заменить отношением концентраций.

Если проницаемость мембраны для обоих ионов определяется лишь их подвижностью, то при разности концентраций по обе ее стороны возникает диффузионный потенциал, определяемый большей подвижностью ионов Cl^- по сравнению с Na^+. Поэтому более разведенный раствор станет электроотрицательным по отношению к более концентрированному. Разность потенциалов равна (ср. (10.13))

$$\Delta\psi = \frac{RT}{\mathcal{F}} \frac{u_{Na} - u_{Cl}}{u_{Na} + u_{Cl}} \ln \frac{c_1}{c_2}, \qquad (10.15)$$

где $u_{Na} = 5{,}2$, $u_{Cl} = 7{,}9$ (мкм/с) (см/В) — подвижности ионов. Если отношение концентраций по обе стороны мембраны $c_1/c_2 = 10$, то $\Delta\psi = -12$ мВ. Если мембрана проницаема только для Na^+, то $u_{Cl} = 0$ и мы получаем *уравнение Нернста*, совпадающее с (10.13):

$$\Delta\psi = \frac{RT}{\mathcal{F}} \ln \frac{c_1}{c_2}. \qquad (10.16)$$

При $c_1/c_2 = 10$ разность потенциалов $\Delta\psi = 60$ мВ.

В биологии мы имеем дело с более сложной системой — необходимо учесть наличие по крайней мере трех сортов ионов: K^+, Na^+, Cl^-.

Считая электрическое поле постоянным и однородным по всей толщине мембраны, Ходжкин и Катц (1949) вывели формулу для $\Delta\psi$ — потенциала покоя, рассматриваемого как диффузионный потенциал. Токи одновалентных ионов через мембрану равны

$$\begin{aligned} I_K &= -RTu_K \frac{dc_K}{dx} - c_K u_K \mathcal{F} \frac{d\psi}{dx}, \\ I_{Na} &= -RTu_{Na} \frac{dc_{Na}}{dx} - c_{Na} u_{Na} \mathcal{F} \frac{d\psi}{dx}, \\ I_{Cl} &= RTu_{Cl} \frac{dc_{Cl}}{dx} - c_{Cl} u_{Cl} \mathcal{F} \frac{d\psi}{dx}. \end{aligned} \qquad (10.17)$$

Для однородного поля и однородной мембраны

$$\frac{d\psi}{dx} = -\frac{\Delta\psi}{\Delta x}, \qquad (10.18)$$

где Δx — толщина мембраны. Подстановка (10.18) в первое урав-

нение (10.17) и интегрирование от c_K^i до c_K^e дает

$$I_K = \frac{u_K \mathcal{F} \Delta\psi}{\Delta x} \frac{c_K^e - c_K^i \exp(-\mathcal{F}\Delta\psi/RT)}{1 - \exp(-\mathcal{F}\Delta\psi/RT)}. \qquad (10.19)$$

Коэффициент проницаемости мембраны для ионов K^+ равен

$$P_K = u_K RT/(\Delta x \mathcal{F}). \qquad (10.20)$$

Из (10.19) и (10.20) следует

$$I_K = \frac{P_K \mathcal{F}^2 \Delta\psi}{RT} \frac{c_K^e - c_K^i \exp(-\mathcal{F}\Delta\psi/RT)}{1 - \exp(-\mathcal{F}\Delta\psi/RT)}. \qquad (10.21)$$

Общий ток равен сумме трех токов I_K, I_{Na}, I_{Cl}:

$$I = \frac{P_K \Delta\psi \mathcal{F}^2}{RT} \frac{w - y \exp(-\mathcal{F}\Delta\psi/RT)}{1 - \exp(-\mathcal{F}\Delta\psi/RT)}, \qquad (10.22)$$

где

$$w = c_K^e + \frac{P_{Na}}{P_K} c_{Na}^e + \frac{P_{Cl}}{P_K} c_{Cl}^i, \quad y = c_K^i + \frac{P_{Na}}{P_K} c_{Na}^i + \frac{P_{Cl}}{P_K} c_{Cl}^e.$$

При очень малом ионном токе I, т. е. при большом сопротивлении мембраны, $I \approx 0$, $w \approx y \exp(-\mathcal{F}\Delta\psi/RT)$, откуда

$$\Delta\psi = \frac{RT}{\mathcal{F}} \ln \frac{y}{w},$$

или

$$\Delta\psi = \frac{RT}{\mathcal{F}} \ln \frac{P_K c_K^i + P_{Na} c_{Na}^i + P_{Cl} c_{Cl}^e}{P_K c_K^e + P_{Na} c_{Na}^e + P_{Cl} c_{Cl}^i}. \qquad (10.23)$$

Мы получили *формулу Ходжкина — Катца*. Она хорошо согласуется с опытом при больших c_K^e или малых c_K^i. При уменьшении c_K^e или увеличении c_K^i величина $\Delta\psi$ стремится к некоторому пределу. Произведение $P_K c_K^i$ ведет себя как постоянная величина; увеличение потенциала покоя $\Delta\psi$ приводит к уменьшению коэффициента проницаемости P_K. Для объяснения этих фактов построены теоретические модели, учитывающие необходимость преодоления активационных барьеров ионами, проходящими сквозь мембрану. Мы вернемся к этим вопросам в § 10.6 и 11.3.

§ 10.5. Активный мембранный транспорт

Повышенная концентрация ионов K^+ и пониженная концентрация ионов Na^+ внутри клетки определяются активным мембранным транспортом, происходящим в направлении, противоположном направлению падения электрохимического потенциала.

Активный транспорт — одна из важнейших особенностей жизненных процессов. Он разрешает противоречие между сохранением пространственной гетерогенности и метаболизмом — обменом веществом и энергией с окружающей средой.

Активный транспорт реализуется в результате сопряжения диффузионных потоков с экзергоническими реакциями, проходящими в толще мембраны. Перенос вещества происходит за счет свободной энергии, выделяемой при химических реакциях. Как правило, это энергия гидролиза АТФ. Указанное сопряжение не тривиально. Как уже говорилось (см. с. 312), коэффициенты сопряжения скалярных и векторных потоков в изотропной системе равны нулю, согласно принципу Кюри. Сопряжение

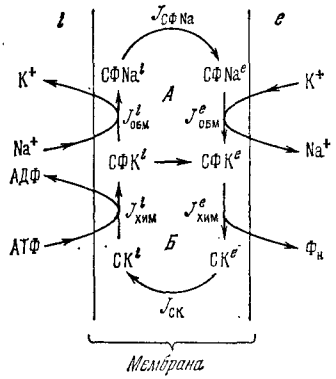


Рис. 10.7. Термодинамическая схема натриевого насоса. Индексы *i* и *e* относятся к внутренней и внешней сторонам мембраны; *А* — ионообменный, *Б* — химический цикл

химических реакций с диффузией может быть косвенным, возникая в результате поддержания стационарного состояния (с. 322). С другой стороны, реализуется и прямое сопряжение вследствие анизотропии мембраны. Наконец, существует *транспорт, облегченный* химической реакцией (facilitated transport). В этом случае транспорт ускоряется благодаря присутствию в мембране *переносчика* (carrier) — вещества, взаимодействующего с переносимыми ионами или молекулами. Ионы или молекулы образуют комплекс с переносчиком на внешней стороне мембраны. Этот комплекс расщепляется на внутренней стороне. Ни переносчик (C), ни его комплекс с переносимым веществом (S) не покидают мембрану. Внутри мембраны протекает реакция

$$S + C \rightleftharpoons CS.$$

Через мембрану проходит поток реагента S. Из условия стационарности следует, что поток переносчика в мембране J_C компенсируется противоположным потоком комплекса J_{CS}:

$$J_C + J_{CS} = 0,$$

т. е. имеет место циркуляция C.

Рассмотрим в связи с этим *натриевый насос* — находящееся в клеточной мембране (в частности, в мембране нервной клетки) устройство, использующее свободную энергию АТФ для активного транспорта ионов Na^+ и K^+ в направлениях их возрастающих концентраций. В основе этого устройства действует фермент K, Na-*активируемая АТФ-аза*. Опишем натриевый насос в тер-

минах переносчиков, которые могут фосфорилироваться и дефосфорилироваться в разных областях мембраны:

$$С + АТФ \rightarrow СФ + АДФ.$$

Предположим, что АТФ и АДФ реагируют лишь на внутренней стороне мембраны. Фосфорилированный переносчик СФ дефосфорилируется в результате некоего конформационного превращения

$$СФ \xrightarrow{H_2O} С + Ф.$$

Допустим, что переносчик С — белок, имеющий большое химическое сродство к K^+, а СФ — белок, преимущественно связывающий Na^+. Натриевый насос работает как система двух циклов, в которой один цикл движет другой цикл (рис. 10.7). Первый цикл имеет характер ионообменного:

$$СФК + Na^+ \rightleftharpoons СФNa + K^+.$$

Второй цикл — химический, в нем происходят реакции фосфорилирования и дефосфорилирования.

В стационарном состоянии

$$\frac{dCK^i}{dt} = -J^i_{хим} + J_{СК} = 0, \quad \frac{dCK^e}{dt} = J^e_{хим} - J_{СК} = 0,$$

т. е.

$$J^e_{хим} = J_{хим} = J_{СК}. \tag{10.24}$$

Для химического цикла получаем

$$\frac{dC\Phi Na^i}{dt} = J^i_{обм} - J_{СФNa} = 0, \quad \frac{dC\Phi Na^e}{dt} = J_{СФNa} - J^e_{обм} = 0,$$

т. е.

$$J^i_{обм} = J^e_{обм} = J_{СФNa} \tag{10.25}$$

и

$$\begin{aligned} \frac{dC\Phi K^i}{dt} &= J^i_{хим} - J^i_{обм} - J_{СФК} = 0, \\ \frac{dC\Phi K^e}{dt} &= J_{СФК} + J^e_{обм} - J^e_{хим} = 0, \end{aligned} \tag{10.26}$$

т. е.

$$J_{СФК} = J^i_{хим} - J^i_{обм} = J^e_{хим} - J^e_{обм}. \tag{10.27}$$

Функция диссипации имеет вид

$$\begin{aligned} T\sigma = J_{СК}\Delta\mu_{СК} + J^i_{хим}\mathcal{A}^i_{хим} + J^e_{хим}\mathcal{A}^e_{хим} + J_{СФК}\Delta\mu_{СФК} + \\ + J_{СФNa}\Delta\mu_{СФNa} + J^i_{обм}\mathcal{A}^i_{обм} + J^e_{обм}\mathcal{A}^e_{обм}, \end{aligned} \tag{10.28}$$

где

$$\Delta\mu_{СК} = \mu^e_{СК} - \mu^i_{СК}, \quad \Delta\mu_{СФК} = \mu^e_{СФК} - \mu^i_{СФК}, \quad \Delta\mu_{СФNa} = \mu^i_{СФNa} - \mu^e_{СФNa},$$

$$\mathcal{A}^i_{хим} = \mu_{АТФ} + \mu^i_{СК} - \mu_{АДФ} - \mu^i_{СФК},$$

$$\mathcal{A}^e_{хим} = \mu^e_{СФК} + \mu_{H_2O} - \mu^e_{СК} - \mu_{Ф},$$

$$\mathcal{A}^i_{обм} = \mu^i_{СФК} + \mu^i_{Na} - \mu^i_{СФNa} - \mu^i_{K},$$

$$\mathcal{A}^e_{обм} = \mu^e_{СФNa} + \mu^e_{K} - \mu^e_{СФК} - \mu^e_{Na}.$$

Следовательно,

$$T\sigma = J_{\text{хим}}(\mu_{\text{АТФ}} + \mu_{H_2O} - \mu_{\text{АДФ}} - \mu_{\Phi}) + J_{\text{обм}}[(\mu^i_{Na} - \mu^e_{Na}) - (\mu^i_K - \mu^e_K)] = J_{\text{хим}}\mathcal{A}_{\text{хим}} + J_{\text{обм}}\mathcal{A}_{\text{обм}}. \quad (10.29)$$

Коэффициент ионного обмена равен

$$\Gamma = \frac{[K^i]\,[Na^e]}{[K^e]\,[Na^i]}. \quad (10.30)$$

Феноменологические соотношения имеют вид

$$J_{\text{обм}} = L_{11}\mathcal{A}_{\text{обм}} + L_{12}\mathcal{A}_{\text{хим}}, \quad J_{\text{хим}} = L_{12}\mathcal{A}_{\text{обм}} + L_{22}\mathcal{A}_{\text{хим}}. \quad (10.31)$$

Если $L_{12} \neq 0$ и $\mathcal{A}_{\text{хим}} \neq 0$, то, так как при $J_{\text{обм}} = 0$

$$\mathcal{A}_{\text{обм}} = -RT \ln \Gamma = -\frac{L_{12}}{L_{11}}\mathcal{A}_{\text{хим}},$$

Γ отлично от единицы и L_{11}, $L_{22} > 0$. В случае эритроцитов

$$\Gamma = \exp\left(\frac{L_{12}}{L_{11}}\frac{\mathcal{A}_{\text{хим}}}{RT}\right) \approx 220.$$

Таким образом, работа натриевого насоса поддерживается сопряжением двух циклов — ионообменного и химического.

Феноменологическое описание показывает, что работа натриевого насоса возможна вблизи равновесия — в условиях линейности.

Перейдем к молекулярному рассмотрению. Как уже сказано, источником свободной энергии для активного транспорта служит АТФ. АТФ усиливает активный транспорт, будучи введена внутрь клетки, но не влияет на него, находясь во внешней среде. Из клеточных мембран удалось выделить K, Na-активируемую АТФ-азу. Этот фермент расщепляет АТФ только в присутствии ионов K^+ и Na^+. Действие АТФ в мембране непосредственно связано с активным транспортом — глюкозид оубаин ингибирует АТФ-азу при той же концентрации, при которой он прекращает работу натриевого насоса. Гидролиз АТФ *in vitro* с помощью этой АТФ-азы происходит в две стадии. Вначале выделяется АДФ, а неорганический фосфат остается связанным с ферментом. Эта стадия активируется ионами Na^+. Второй этап требует ионов K^+ и состоит в отщеплении фосфата от фермента. Сходная, но уже пространственная асимметрия свойственна насосу — на внутренней поверхности мембраны его активность зависит от c^i_{Na}, на внешней — от c^e_K. При расщеплении АТФ на мембранах наблюдается переход меченого фосфата из АТФ в фосфопротеиды мембраны. Кинетика действия АТФ-азы *in vitro* характеризуется S-образной зависимостью скорости реакции от концентраций Na^+, K^+ и АТФ. Гидролиз одной молекулы АТФ в мембране сопровождается выходом из клетки двух-трех ионов Na^+.

K, Na-активируемая АТФ-аза представляет собой тетрамерный белок с м. м. около 250 000. Белок содержит два типа субъеди-

ниц: α (м. м. 84 000) и β (м. м. 57 000), по две каждого сорта. Лишь субъединица α присоединяет фосфорную метку из меченой АТФ. На основе этих фактов была предложена модель активного транспорта, определяемого конформационными превращениями АТФ-азы. Изменение конформации вызывает изменения сродства к катионам соответствующих активных центров. В одной конформации α-субъединица связывает Na^+ и β-субъединица — K^+, а в другой — наоборот. Конформационное превращение сопровождается гидролизом АТФ, отщепленный фосфат первоначально присоединяется к α-субъединице. Мы вновь встречаемся здесь с электронно-конформационными взаимодействиями (см. с. 195).

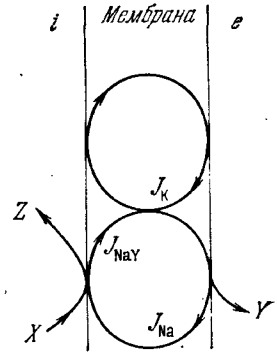


Рис. 10.8. Сопряжение ионных потоков с химической реакцией в мембране (Y — фосфат)

Рассмотрим кинетическую модель процесса. Предположим, что имеются два типа активных центров, способных присоединять и обменивать Na^+ и K^+. Первый тип центров неспецифичен, эти центры участвуют в пассивном транспорте. Центры второго типа принадлежат АТФ-азе и обеспечивают активный транспорт.

Фермент (Е) катализирует гидролиз АТФ. Обозначим АТФ буквой X, АДФ (и АМФ) — буквой Z, фосфат — буквой Ф. Связь ионообменной реакции с ферментативной представим уравнением

$$Na^i + E^i \cdot K + X \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} E^i \cdot Na \cdot Ф + Z + K^i.$$

Индекс i по-прежнему относится к внутренней, e — к внешней сторонам мембраны. На внешней стороне

$$K^e + E^e \cdot Na \cdot Ф \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} E^e \cdot K + Ф + Na^e.$$

Комплекс Na·Ф, распадающийся на внешней стороне мембраны, перемещается к ней от места своего образования по градиенту концентрации. Если сродство обменных центров к ионам велико и свободные центры отсутствуют, то перемещение комплекса Na·Ф и обмен на K можно представить в виде обменной реакции

$$E^i \cdot Na \cdot Ф + E^e \cdot K \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftarrows}} E^i \cdot K + E^e \cdot Na \cdot Ф.$$

Таким образом, обобщенная сила, перемещающая ионы,— разность химических потенциалов продукта Z, которая поддерживается ферментативной реакцией.

Предположим далее, что обмен ионов на активных центрах и ферментативная реакция кооперативны — центры взаимодействуют друг с другом. Кооперативный обмен наблюдается, например, в цеолитах, где он определяется изменением структуры решетки вследствие обмена ионов. Соответственно введем в уравнение реакций стехиометрические коэффициенты ρ, ν, $\varkappa$, не равные 1.

Общая схема реакций имеет вид ($Y \equiv Ф$)

$$\begin{array}{ccc} \rho Na^i + E^i\cdot K_\nu + \varkappa X \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} E^i\cdot Na_\rho\cdot Y_\varkappa + \nu K^i + \varkappa Z \\ J_{Na}\uparrow\downarrow \quad k_{-3}\uparrow\downarrow k_3 \qquad\qquad k_3\uparrow\downarrow k_{-3} \quad \uparrow\downarrow J_K \\ \rho Na^e + E^e\cdot K_\nu + \varkappa Y \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} E^e\cdot Na_\rho\cdot Y_\varkappa + \nu K^e \end{array}$$

Здесь J_{Na} и J_K — пассивные потоки. Сопряжение потоков изображено на рис. 10.8. Кинетические уравнения реакций имеют вид

$$\begin{aligned} s^{-1}\dot c_X &= -k_1\left(c^i_{Na}\right)^\rho (c_X)^\varkappa n^i_K + k_{-1}\left(c^i_K\right)^\nu (c_Z)^\varkappa n^i_{Na}, \\ s^{-1}\dot c^i_{Na} &= -k_1\left(c^i_{Na}\right)^\rho (c_X)^\varkappa n^i_K + k_{-1}\left(c^i_K\right)^\nu (c_Z)^\varkappa n^i_{Na} + J_{Na}, \\ s^{-1}\dot c^e_{Na} &= k_2\left(c^e_K\right)^\nu n^e_{Na} - k_{-2}\left(c^e_{Na}\right)^\rho (c_Y)^\varkappa n^e_K - J_{Na}, \\ s^{-1}\dot c^i_K &= k_1\left(c^i_{Na}\right)^\rho (c_X)^\varkappa n^i_K - k_{-1}\left(c^i_K\right)^\nu (c_Z)^\varkappa n^i_{Na} + J_K, \end{aligned} \tag{10.32}$$

$$\dot n^i_K = -k_1\left(c^i_{Na}\right)^\rho (c_X)^\varkappa n^i_K + k_{-1}\left(c^i_K\right)^\nu (c_Z)^\varkappa n^i_{Na} + sk_3 n^i_{Na} n^e_K + sk_{-3} n^i_K n^e_{Na}.$$

Здесь c^i, c^e — безразмерные концентрации ионов внутри и вне клетки, отнесенные к молярным концентрациям воды в соответствующих объемах $c^i_{H_2O}$, $c^e_{H_2O}$; n^i_K, n^e_{Na} — числа занятых ионами обменных центров фермента на единицу площади внутренней и внешней поверхностей мембраны, s — площадь мембраны. Одновременно

$$n^i_K + n^i_{Na} = n^i, \quad n^e_K + n^e_{Na} = n^e, \tag{10.33}$$

$$\begin{aligned} sn^i_K + sn^e_K + c^i_{H_2O}c^i_K + c^e_{H_2O}c^e_K &= n_K, \\ sn^i_{Na} + sn^e_{Na} + c^i_{H_2O}c^i_{Na} + c^e_{H_2O}c^e_{Na} &= n_{Na}. \end{aligned} \tag{10.34}$$

Соотношения (10.33) и (10.34) выражают сохранение числа обменных центров на поверхностях мембраны и полного числа ионов каждого сорта.

В стационарном состоянии правые части (10.32) равны нулю. В клетке расходуется только АТФ (X).

Из двух первых уравнений (10.32) следует, что активный выход Na^+ из клетки определяется скоростью реакции $\dot c_X$ и в стационарном состоянии компенсируется пассивным потоком J_{Na}.

Считая ферментативные реакции необратимыми, положим $k_{-1} = k_{-2} = k_{-3} = 0$. В этом приближении активный поток Na^+ из клетки равен

$$J = k_1\left(c^i_{Na}\right)^\rho (c_X)^\varkappa n^i_K = k_2\left(c^e_K\right)^\nu n^e_{Na} = sk_3 n^i_{Na} n^e_K. \tag{10.35}$$

Считая концентрации ионов Na^+ и K^+ в растворах независимыми друг от друга, получаем отсюда

$$c^i_{Na} = \left[\frac{k_3 s}{k_1 (c_X)^\varkappa \left(k_3 s n^i + k_2\left(c^e_K\right)^\nu\right)} \frac{J(J_0 - J)}{J_\infty - J}\right]^{1/\rho}. \tag{10.36}$$

Здесь

$$J_0 = k_2 n^e \left(c^e_K\right)^\nu, \quad J_\infty = sk_3 k_2 n^i n^e \left(c^e_K\right)^\nu / \left(sk_3 n^i + k_2\left(c^e_K\right)^\nu\right).$$

Таким образом, c^i_{Na} выражена как функция потока при заданных c^e_K, c_X. Анализ выражения (10.36) показывает, что кривая $c^i_{Na}(J)$ имеет перегиб в интервале $0 < J < J_\infty$, что согласуется с опытом. То же относится к кривой $c^e_K(J)$. Если $\rho = \nu = 1$, т. е. нет кооперативности, то нет и перегиба.

Описанная кинетическая модель согласуется с опытом и показывает, что специфическая роль белка-фермента в мембранном транспорте состоит в сопряжении транспорта с метаболизмом.

Мы не обсуждаем пока конкретные пути переноса ионов через мембраны. Ионы переносятся через специальные *каналы*, о которых пойдет речь далее (см. § 10.6, 11.4).

§ 10.6. Перенос заряженных частиц через мембраны

Электропроводность клеточных мембран составляет примерно 10^{-3} Ом$^{-1}\cdot$см$^{-2}$, для искусственных липидных мембран (см. с. 335) она значительно меньше — порядка 10^{-8} Ом$^{-1}\cdot$см$^{-2}$. Эти величины на много порядков меньше, чем электропроводность 0,01 М KCl в воде, равная 10^{4} Ом$^{-1}\cdot$см$^{-2}$.

Низкая ионная электропроводность липидной мембраны, рассматриваемой как однородная среда, определяется низкой диэлектрической проницаемостью (2—3) липидов, неблагоприятной для внедрения заряженных частиц. Коэффициент распределения частиц между липидной и водной фазами равен $\exp(-W/RT)$, где W — энергия частицы в липиде, отсчитанная от энергии в воде. Она складывается из электростатической энергии и энергии гидрофобного взаимодействия

$$W = W_e + W_h. \tag{10.37}$$

Основным является первый член, равный для сферических частиц с радиусом a

$$W_e = \frac{q_0}{a}\left(\frac{1}{\varepsilon} - \frac{1}{\varepsilon_w}\right). \tag{10.38}$$

Здесь $q_0 = z^2e^2/2\kappa T$ (z — валентность иона, e — заряд электрона), ε — диэлектрическая проницаемость липида, $\varepsilon_w = 81$ — воды. При $T = 25\,^\circ$C $z = 1$, $q_0 = 28{,}2$ нм. Если $a = 0{,}2$ нм, $\varepsilon = 3$, то $\exp(-W/RT) = 10^{-20}$.

Однако энергия иона в мембране снижается по крайней мере благодаря четырем факторам (Маркин, Пастушенко, Чизмаджев, 1977):

1. Мембрана имеет конечную толщину.
2. Ионы могут образовывать ионные пары внутри мембраны.
3. Мембрана может иметь поры (каналы) с высокой диэлектрической проницаемостью.
4. Ион может переноситься ионофором, переносчиком, увеличивающим эффективный радиус a.

Эти четыре эффекта схематически представлены на рис. 10.9. Рассмотрим их роль последовательно.

На границе между мембраной и водной фазой возникают *силы изображения*. Электростатическая энергия W_e иона в мембране несколько снижается и принимает вид кривой, показанной

на рис. 10.9, *а*. За счет этого эффекта энергия понижается на величину порядка a/l, т. е. на несколько процентов. Высота барьера составляет порядка сотни кДж/моль.

Образование ионных пар также не дает заметного выигрыша — максимальное понижение энергии не более чем двукратное.

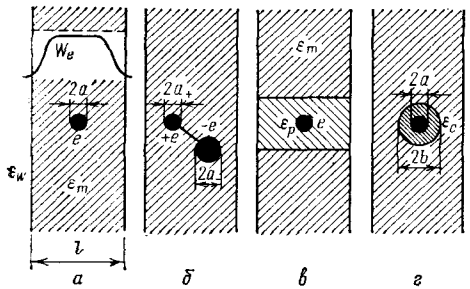


Рис. 10.9. К расчету энергии иона в мембране: *а* — влияние сил изображения, *б* — образование ионных пар, *в* — гидрофильная пора в мембране, *г* — влияние комплексообразования

Поры с высокой поляризуемостью могут значительно понизить энергию заряда в мембране (рис. 10.9, *в*). При $b \ll l$ энергия частицы на оси поры равна

$$W_p = \frac{e^2}{2\varepsilon_p a} + \frac{e^2}{\varepsilon_m b} P\left(\frac{\varepsilon_m}{\varepsilon_p}\right). \qquad (10.39)$$

Второй член в этой формуле вызван силами изображения в стенках поры. Функция $P(x)$ рассчитана численно, ее значение не превышает 0,25. Если ε_p сравнима с ε_w, то второй член в W_p превалирует. При $\varepsilon_m = 2$ величина $W_p \approx 1180/b$ (нм) кДж/моль.

Четвертый фактор — *индуцированный ионный транспорт*. Ряд веществ служит *ионофорами* — переносчиками щелочных катионов. Сюда, в частности, относятся депсипептиды, циклические антибиотики (например, валиномицин), детально изученные в работах Шемякина, Овчинникова, Иванова, а также Прессмана с сотрудниками. Другая группа переносчиков — монактин и др.— макротетролиды, циклические соединения, содержащие четыре эфирные и четыре сложноэфирные связи.

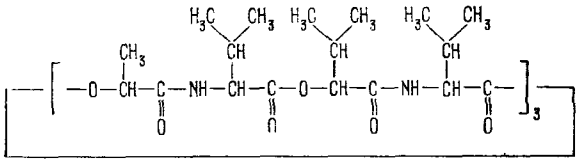
Строение некоторых циклических переносчиков показано на рис. 10.10. Ионофоры представляют собой нейтральные молекулы с высокой поляризуемостью, образующие с ионом сферические комплексы (см. рис. 10.9, *г* и рис. 10.11). Энергия комплекса в среде равна

$$W_c = \frac{e^2}{2\varepsilon_m b} + \frac{e^2}{2\varepsilon_c}\left(\frac{1}{a} - \frac{1}{b}\right). \qquad (10.40)$$

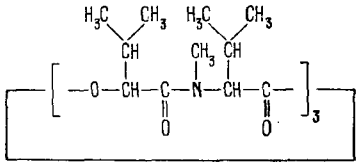
При большой поляризуемости ионофора можно пренебречь вторым членом. При $b \approx 0{,}5-1$ нм при 25 °С

$$W_c = 69{,}3 - 34{,}4 \text{ кДж/моль}.$$

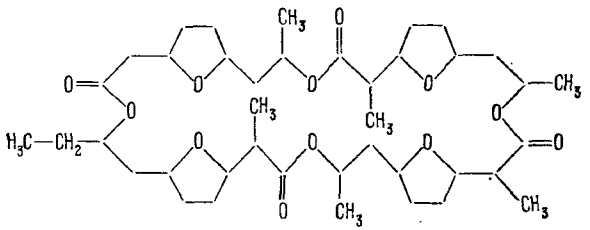
Отсюда следует, что ионофор может значительно снизить барьер для прохождения иона. Прямые измерения температурной зависимости ионной проводимости мембран в присутствии ионофоров



Валиномицин



Энниатин B



Монактин

Рис. 10.10. Строение некоторых циклических переносчиков

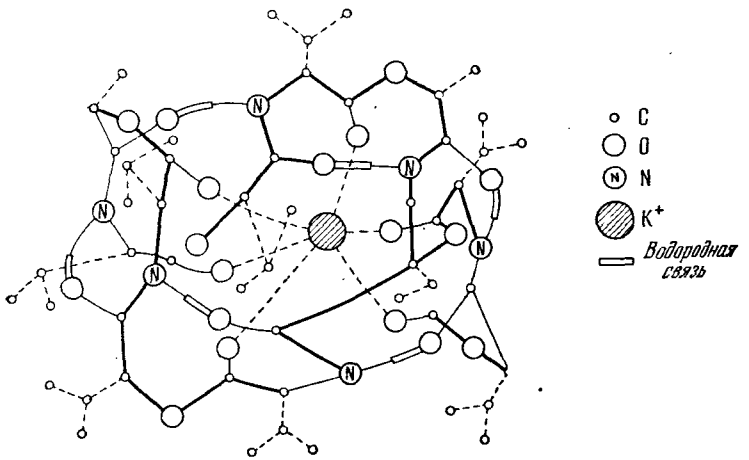


Рис. 10.11. Структура комплекса валиномицина с K^+

показали, что проводимость следует уравнению Аррениуса

$$g = A \exp(-\overset{+}{H}/RT). \qquad (10.41)$$

Энтальпия активации $\overset{+}{H}$ равна для монактина 136,5 кДж/моль, для валиномицина 231 кДж/моль и для грамицидина-А всего лишь 39 кДж/моль. Монактин и валиномицин представляют

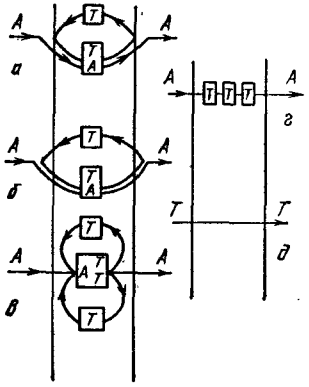


Рис. 10.12. Механизмы переноса ионов через мембрану: *а* — подвижные переносчики с «малой каруселью» (переносчик *T* заключен в мембране, а комплексообразование происходит на границах раздела мембрана — раствор); *б* — подвижные переносчики с «большой каруселью» (переносчик *T* имеется и в мембране, и в растворе, комплексообразование происходит в растворе); *в* — коллективный транспорт (ион *A* переносится несколькими частицами переносчика *T*); *г* — эстафетный транспорт; *д* — прямое прохождение

собой подвижные переносчики, а грамицидин-А образует в мембране полярную пору. В присутствии валиномицина и монактина проводимость резко уменьшается при «замораживании» липидной мембраны, в присутствии грамицидина-А этого эффекта нет. Транспорт, облегченный образованием пор, имеет эстафетный механизм — пóра может быть образована несколькими последовательно расположенными молекулами, между которыми происходит передача иона. Ион может переноситься не одной, а сразу несколькими молекулами ионофора — это коллективный механизм. Различные механизмы индуцированного ионного транспорта схематически показаны на рис. 10.12.

Как уже указывалось (с. 339), мембранный транспорт может быть связан с наличием «кинков» — подвижных дефектов структуры в жидкокристаллической липидной фазе. Имеются не реализованные еще возможности трактовки такого рода эффектов на основе теории *дислокаций*.

Обсуждая мембранный транспорт одновалентных катионов, мы вплотную подошли к проблемам, относящимся к возбудимым мембранам, к генерации и распространению нервного импульса.

§ 10.7. Молекулярная рецепция

В рецепции внешних сигналов органами чувств участвуют специфические для каждого органа рецепторные клетки и системы клеток, в которых происходит трансформация сигнала — зрительного, слухового, обонятельного, вкусового, осязательного —

в нервные импульсы. Природа такой трансформации во многом не ясна. Здесь мы остановимся на рецепции молекулярных сигналов, к которой сводятся обоняние и вкус. О зрительной рецепции рассказано в гл. 14, о механической — в § 12.6 и 12.7.

Различные рецепторные клетки имеют выросты — антенны, плазматические мембраны которых содержат белки, специфические для данного вида рецепции. Антенны могут состоять из так называемых микровилл и являющихся результатами их дифференцировки стереоциллий или киноциллий — ресничек, жгутиков и их производных. В эти образования входят фибриллярные белки. Жгутики обычно построены по принципу $9 \cdot 2 + 2$, т. е. имеют 9 пар фибрилл на периферии и одну в центре (см. § 12.6). В других случаях структурный аппарат антенн представлен формулой $9 \cdot 2 + 0$.

Обонятельная рецепция имеет важнейшее значение для ряда организмов позвоночных и беспозвоночных. Насекомые пользуются языком запахов — выделяемые ими специальные вещества — *феромоны* служат для сигнализации. Имеются феромоны, применяемые общественными насекомыми — муравьями — в качестве сигналов тревоги и указателей пути к запасам пищи. Бабочки пользуются феромонами в качестве половых аттрактантов, что было открыто еще Фабром. Ряд феромонов удалось получить в чистом виде, в частности, *бомбикол*, половой аттрактант самки тутового шелкопряда *Bombyx mori*. Бутенандт выделил 4 мг бомбикола из 313 000 бабочек и определил его строение:

$$H_3C—CH_2—CH_2—CH=CH—CH=CH-(CH_2)_7—CH_2OH.$$

Чувствительность бабочек к бомбиколу очень велика — для возбуждения самца достаточно 10^{-18} г в 1 см^3 растворителя, т. е. 2500 молекул. Встречающиеся иногда в литературе утверждения об электромагнитной сигнализации у насекомых не имеют никаких оснований. Ориентация по запаху установлена для многих организмов — млекопитающих, рыб и т. д.

Высокая чувствительность обонятельных рецепторов показывает, что запах переносится молекулами. Пороговые концентрации пахучих веществ, воспринимаемых человеком, составляют $4 \cdot 10^{-7}$ для скатола, $4{,}4 \cdot 10^{-8}$ для этилмеркаптана и $5 \cdot 10^{-9}$ мг/л для тринитробутилтолуола. Пахучее вещество должно быть достаточно летучим и растворяться в воде и в липидах — рецепторные клетки находятся в слизистом, водном окружении и вещество должно проникать сквозь мембраны.

Было выдвинуто предположение, что рецепция запаха основана на резонансе атомных колебаний молекул пахучего вещества и молекулярных структур рецептора. Эту теорию, именуемую вибрационной или квантовой, нельзя считать аргументированной. Характер запаха и его интенсивность плохо коррелируют с колебательными спектрами вещества. Вещества, имеющие весьма разнящиеся спектры, зачастую имеют сходные запахи и наоборот. Вибрационная теория противоречит элементарным физи-

ческим соображениям. Носовая полость практически замкнута, это своего рода черное тело, и если в него попадают молекулы, то их излучение должно находиться в равновесии со стенками полости. Колебания в такой системе не могут восприниматься.

Монкрифф (1951) предположил, что рецепция запаха основана на стерическом соответствии между структурой молекулы пахучего вещества и структурой некоторой полости в рецепторной клетке. Исходя из этой идеи, Эймур (1962) установил семь первичных запахов, а именно (в скобках пример вещества):

1. Камфорный (камфора),
2. Мускусный (пентадеканолактин),
3. Цветочный (фенилметилэтилкарбинол),
4. Мятный (ментол),
5. Эфирный (дихлорэтилен),
6. Едкий, острый (муравьиная кислота),
7. Гнилостный (бутилмеркаптан).

Сопоставление структур веществ, обладающих этими запахами, показало, что запах определяется не химическим составом, а формой и размерами молекул. На рис. 10.13 показаны структуры молекул и формы соответствующих полостей. Едкий и гнилостный запахи определяются уже не структурой, а зарядом — электрофильные вещества с малыми молекулами имеют едкий запах ($HCOOH$, SO_2, Cl_2), нуклеофильные — гнилостный (H_2S). Сложные запахи возникают, если различные группы одного и того же вещества размещаются в полостях разного типа. Исходя из теории Эймура, удалось провести направленный синтез пахучего вещества.

Не считая эту классификацию исчерпывающей, можно утверждать, что обонятельная рецепция начинается с узнавания молекулярной структуры пахучих веществ рецепторными участками мембран соответствующих клеток. Такое узнавание реализуется, по-видимому, посредством слабых взаимодействий.

Фесенко и сотрудники исследовали мембраны клеток обонятельного эпителия и установили в них присутствие структур, обладающих высоким сродством к камфоре (лягушка, крыса) и к некоторым аминокислотам (скат). Специфичность взаимодействия с пахучим веществом, высокая константа связывания и отсутствие таких структур в других клетках указывают на наличие обонятельных рецепторных молекул. Обонятельный рецептор для камфоры — белок с м. м. около 125 000.

Взаимодействие рецептора с пахучим веществом приводит к появлению нервного импульса вследствие деполяризации мембраны аксона. Механизм этого процесса пока не ясен. Обонятельный анализатор может воспринимать одну молекулу. Узнавание требует времени порядка 0,1 с.

Молекулярной, но не структурной является *вкусовая рецепция*. Кислый вкус определяется наличием ионов водорода, соленый — такими анионами, как Cl^-. Горький и сладкий вкус возникают при воздействии на рецепторы веществ самого разнообраз-

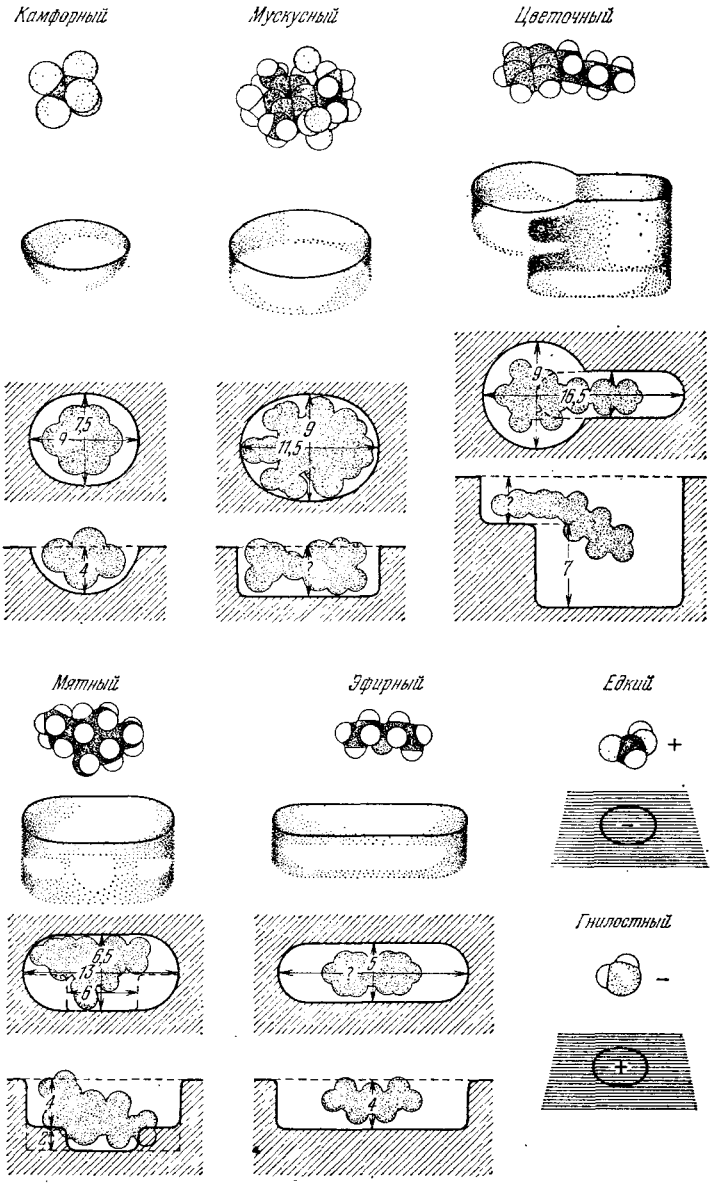


Рис. 10.13. Структуры молекул и ячеек в рецепторных клетках для семи основных запахов по Эймуру

ного строения (горек хинин и сульфат натрия, сладок — сахар и сахарин). Открыты специфические белки растительного происхождения, обладающие высокой вкусовой активностью. Два из них, монеллин и тауматин, обладающие интенсивно сладким

вкусом, являются хемостимуляторами. С другой стороны, гликопротеид миракулин является модификатором вкуса — после его воздействия на язык кислота воспринимается как сладкое вещество. По-видимому, миракулин связывается плазматической мембраной. Кислота изменяет ее конформацию, стимулируя «сладкий» участок мембраны. Вкусовое воздействие в конечном счете должно сводиться к молекулярному узнаванию.

Мембранные рецепторные молекулы — белки, гликопротеиды и др.— участвуют в важнейших биологических явлениях. О формировании иммунитета рассказано в § 4.8 и 17.11. Межклеточные взаимодействия, ответственные за морфогенез (см. § 17.10), осуществляются посредством молекулярных, химических сигналов. Это доказывается прямыми опытами, в которых взаимодействие клеток нарушалось введением между ними кусочка целлофана. При замене целлофана агаром взаимодействие восстанавливалось. Давно было показано, что разделенные клетки губки объединяются вновь при помещении в морскую воду, причем образуются вполне сформированные маленькие губки. Регенерация оказывается видоспецифической. Очевидно, что узнавание, приводящее к упорядочению клеток, требует молекулярной сигнализации, контакта и адгезии клеточных поверхностей.

Установлено, что при контакте происходит увеличение проницаемости клеточных мембран. Образованию контакта предшествует сигнализация посредством специальных веществ, выделяемых клетками. В некоторых случаях удалось эти вещества идентифицировать. Они оказались гликопротеидами с константой седиментации 62,5 S, имеющими форму сфер диаметром 80 нм, снабженных отростками длиною 110 нм и толщиною 4.5 нм. В других случаях сигнализация происходит посредством малых молекул, в частности, посредством цАМФ (см. с. 42).

Перемещение клеток, приводящее к их сортировке, лучше всего объясняется их дифференциальной адгезивностью. Эдельман (1967) предложил гипотезу о природе взаимного узнавания клеток, их движения, а также роста тканей, основанную на поверхностной модуляции. Согласно этой гипотезе поверхности клеток данного типа содержат молекулы специфических гликопротеидов. Последние расщепляются определенными протеазами, и остающиеся на поверхностях фрагменты узнают друг друга. Таким образом, состояние поверхности модулируется протеазами, которые тем самым управляют адгезией клеток в развивающихся тканях. Эти гликопротеиды ответственны за ассоциацию клеток. Можно отметить общность разнообразных явлений химической модуляции поверхности: связи АТ — АГ, присоединение вирусов, взаимодействия с гормонами, взаимодействия сперматозоида с яйцеклеткой и т. д. Гипотеза Эдельмана важна и может служить основой для дальнейших исследований.

Глава 11

ФИЗИКА НЕРВНОГО ИМПУЛЬСА

§ 11.1. Аксон и нервный импульс

Нервное возбуждение распространяется по нервным волокнам — аксонам. Принято разделять нервную систему высших организмов на центральную и периферическую. Последняя содержит аксоны, служащие для передачи сигналов, а также ганглии вегетативной нервной системы. Аксоны — коммуникации для афферентных сообщений от органов чувств, направляемых в центральную систему, и для эфферентных сигналов, направляющихся от центральной системы к мышцам. Аксоны представляют собой длинные отростки центрально расположенных клеток.

Исследование нервного импульса — традиционная проблема биофизики. Уже Гельмгольц измерял скорость распространения нервного импульса. В 1902 г. Бернштейн построил мембранную теорию возбуждения. Благодаря исследованиям Ходжкина, Катца, Хаксли, Тасаки и других ученых, раскрыты принципиальные механизмы генерации и распространения импульса.

Таким образом, о функции аксона известно многое. Но современное состояние науки позволяет лишь формально моделировать работу центральной нервной системы, и мы еще далеки от понимания высших ее функций — памяти и мышления.

На рис. 11.1 представлена схема строения нервной клетки, *нейрона*. Клетка получает сообщения от многих других нейронов через их тонкие ответвления, образующие контакты — *синапсы* — с телом клетки и его короткими отростками — *дендритами*. Длины аксонов в теле крупных животных достигают нескольких метров.

Контакты с другими клетками образуются не только в синапсах. Большая часть поверхности нейрона покрыта прилегающими к нему *глиальными*, или *шванновскими*, *клетками*. Их роль пока не ясна. Из мембран шванновских клеток образуется *миелиновая оболочка* миелинизированных аксонов, показанная на рис. 11.1 схематически. Эта оболочка прерывается через каждые 1—2 мм длины аксона *перехватами Ранвье*, имеющими протяженность около 1 мкм. В области перехватов мембрана аксона контактирует с окружающей средой. Существуют и немиелинизированные аксоны.

Миелиновая оболочка аксона образована многократным спиральным закручиванием мембраны шванновской клетки вокруг

аксона. Миелин представляет собой, таким образом, многослойную (до 250 слоев) мембрану, защищающую мембрану аксона от окружающей среды. На рис. 11.2 показана схема миелиновой мембранной структуры, полученная методом рентгенографии.

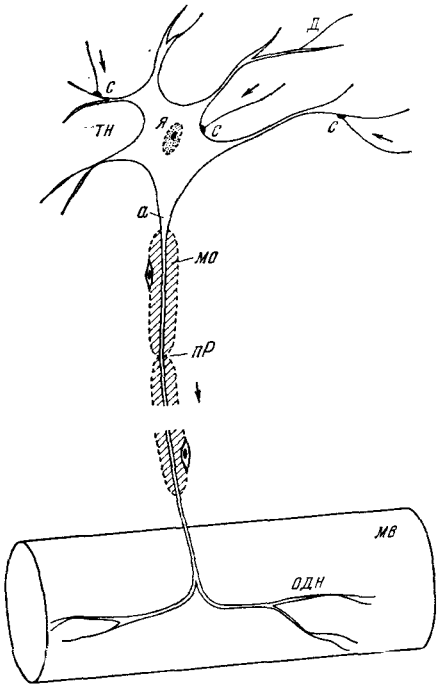


Рис. 11.1. Схема строения нервной клетки (двигательный нейрон): *тн* — тело нейрона, *а* — аксон, *мо* — миелиновая оболочка, *пР* — перехват Ранвье, *д* — дендрит, *я* — ядро, *с* — синапсы, *одн* — окончание двигательного нерва, *мв* — мышечные волокна

Уже давно установлено, что нервы и мышцы способны генерировать электродвижущие силы, *биопотенциалы*. Электрическая активность клеток проявляется в форме коротких разрядов, каждый из которых длится около 1 мс. Современная экспериментальная техника позволяет усиливать эти сигналы и регистрировать их. Установлено, что активность нерва всегда сопровождается электрическими явлениями. На рис. 11.3 показаны импульсы в зрительном нерве краба *Limulus*, вызванные вспышкой света длительностью 1 с (Хартлайн, 1934). Частота и характер последовательности импульсов зависят от интенсивности и спектрального состава света. Величина и длительность отдельного импульса не зависят от природы и силы раздражения.

Электрический сигнал, отвечающий отдельному импульсу, распространяющемуся вдоль аксона, называется *потенциалом действия* или *спайком*. Это основная единица информации, передаваемой по нервному волокну.

Скорость распространения импульса v равна 1—100 м/с, она меньше для немиелизированных и больше для миелинизирован-

ных аксонов. Так, для миелинизированных волокон кошки $v = 10—100$ м/с, для гигантского аксона кальмара (диаметр волокна 600 мкм!) $v \approx 25$ м/с, для немиелинизированных волокон кошки $v = 0{,}7—2{,}3$ м/с.

Несмотря на то, что *аксоплазма* является раствором электролитов, она не служит проводником импульса. Удельное сопротив-

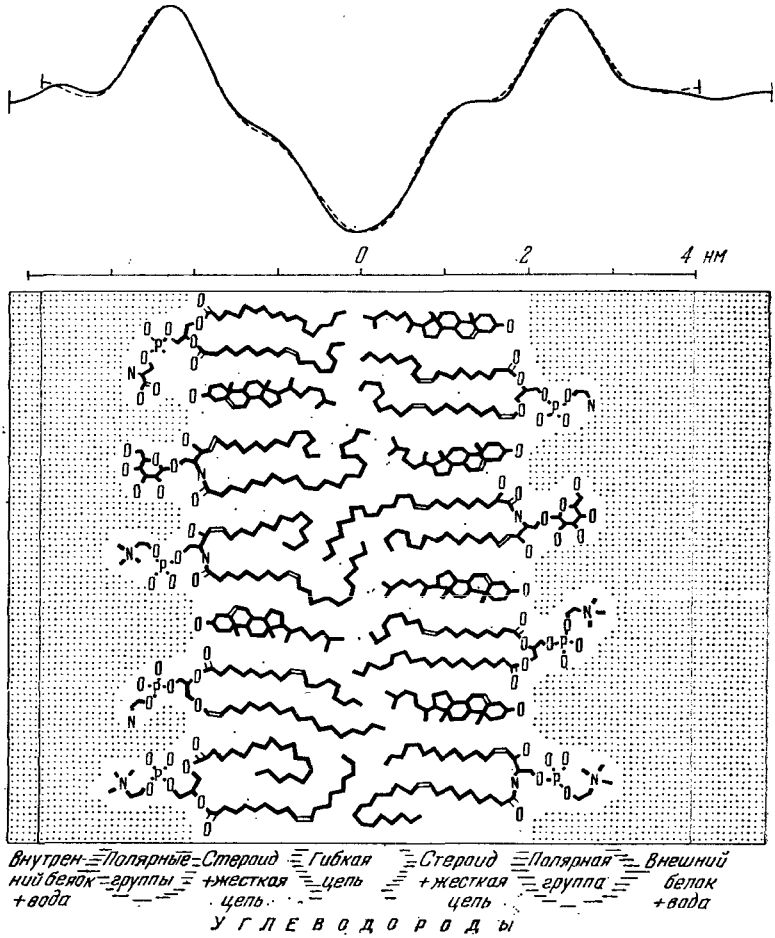


Рис. 11.2. Схема миелиновой мембранной структуры. Вверху — профили электронной плотности для глазного (штриховая линия) и седалищного (сплошная линия) нервов

ление аксоплазмы равно 10—100 Ом · см. Сопротивление на единицу длины волокна диаметром 1 мкм составляет $10^9—10^{10}$ Ом · см, что превышает сопротивление медного провода того же диаметра в 10^8 раз. В таком проводнике велики потери и утечки. Но

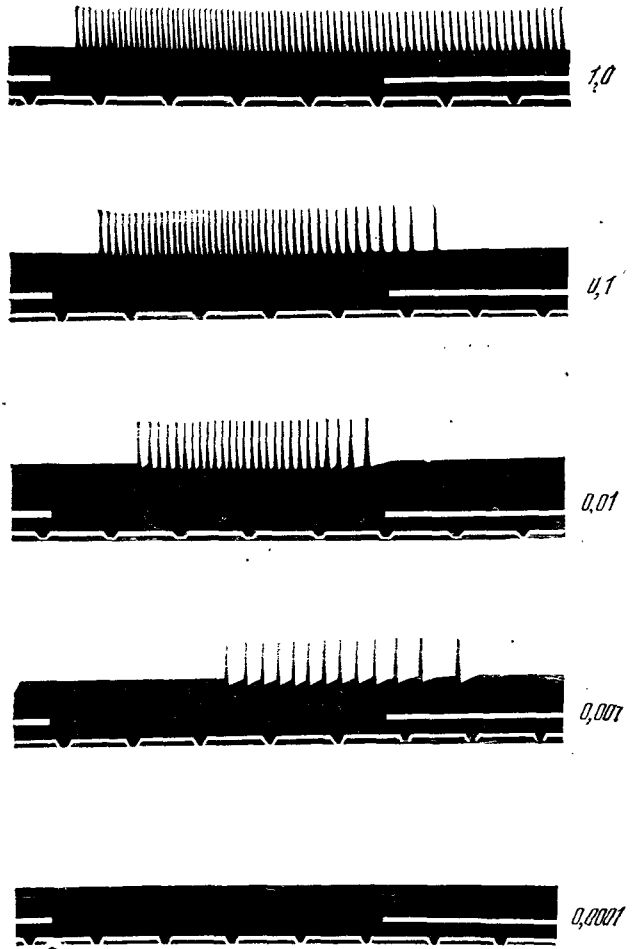


Рис. 11.3. Импульсы в зрительном нервном волокне *Limulus*, вызванные вспышкой света длительностью 1 с. Цифры справа указывают относительную интенсивность вспышки. Период освещения указан разрывом верхней белой линии; отметка времени на нижней белой линии 0,2 с.

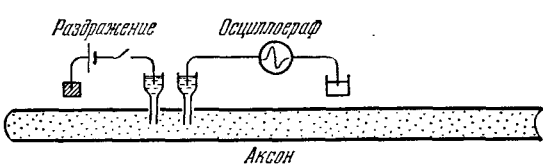


Рис. 11.4. Схема исследования нервного импульса при помощи двух микроэлектродов

аксон передает импульс на расстояния до нескольких метров без затухания и искажения.

В биофизике нерва сыграли большую роль методы работы на изолированных аксонах — введение микроэлектродов в аксон и перфузия, т. е. выдавливание аксоплазмы из волокна и ее замена искусственными растворами. Особенно удобна работа на гигантских аксонах кальмара. Элементарный опыт состоит во введении в аксон двух микроэлектродов: первый служит для электрической стимуляции возбуждения, второй — для измерения генерируемого потенциала (рис. 11.4).

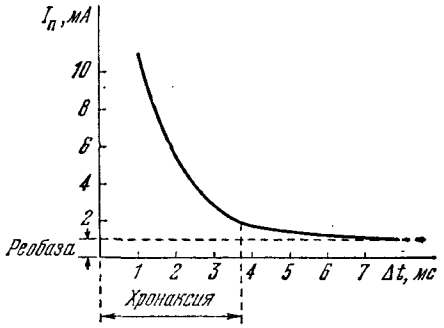


Рис. 11.5. Зависимость силы порогового тока от длительности импульса микроэлектродов

Опыт показывает, что величина и временной ход токов действия не зависят от величины стимулирующего тока и что потенциал действия не возникает, если электрический стимул не достигает некоторого порогового значения. Нервное волокно работает по принципу «все или ничего» — потенциал действия постоянной величины либо возникает, либо нет.

Для возбуждения аксона необходимо некоторое минимальное количество электричества. По мере уменьшения длительности Δt подаваемого импульса необходимо увеличивать силу тока I. Для длительных прямоугольных импульсов существует минимальная сила тока, достаточная для возбуждения; более слабый ток неэффективен при любой длительности. На рис. 11.5 показана кривая зависимости порогового тока $I_п$ от Δt, имеющая форму гиперболы. Обычно ее описывают эмпирической формулой

$$I_п = \frac{a}{\Delta t} + b. \qquad (11.1)$$

Величина b называется *реобазой* — это минимальное значение возбуждающего тока при $\Delta t \to \infty$. При очень коротких импульсах, т. е. при малых Δt, ток $I_п \approx a/\Delta t$, т. е. величина $I_п \Delta t \approx a$ — константа, характеризующая пороговое значение количества электричества. Из формулы (11.1) следует, что при $I_п = 2b$ величина $\Delta t_{хр} = a/b$ (*хронаксия*). Однако в действительности при $\Delta t = a/b$ ток $I_п \approx 1{,}4b$ — формула (11.1) несправедлива для всего интервала значений Δt.

Если сообщить волокну два последовательных стимула, разделенные некоторым интервалом времени, то поведение волокна зависит от этого интервала. Немедленно после генерации импульса данный участок волокна находится в абсолютном *рефрактерном состоянии*, т. е. не может быть возбужден вновь. Затем

следует относительное рефрактерное состояние, в котором увеличено значение порогового потенциала. Продолжительность всего рефрактерного состояния варьирует от одной до нескольких миллисекунд.

В состоянии покоя аксоплазма заряжена отрицательно по отношению к внешней среде. Потенциал покоя равен примерно —80 мВ. Пороговое возбуждение имеет потенциал, равный при-

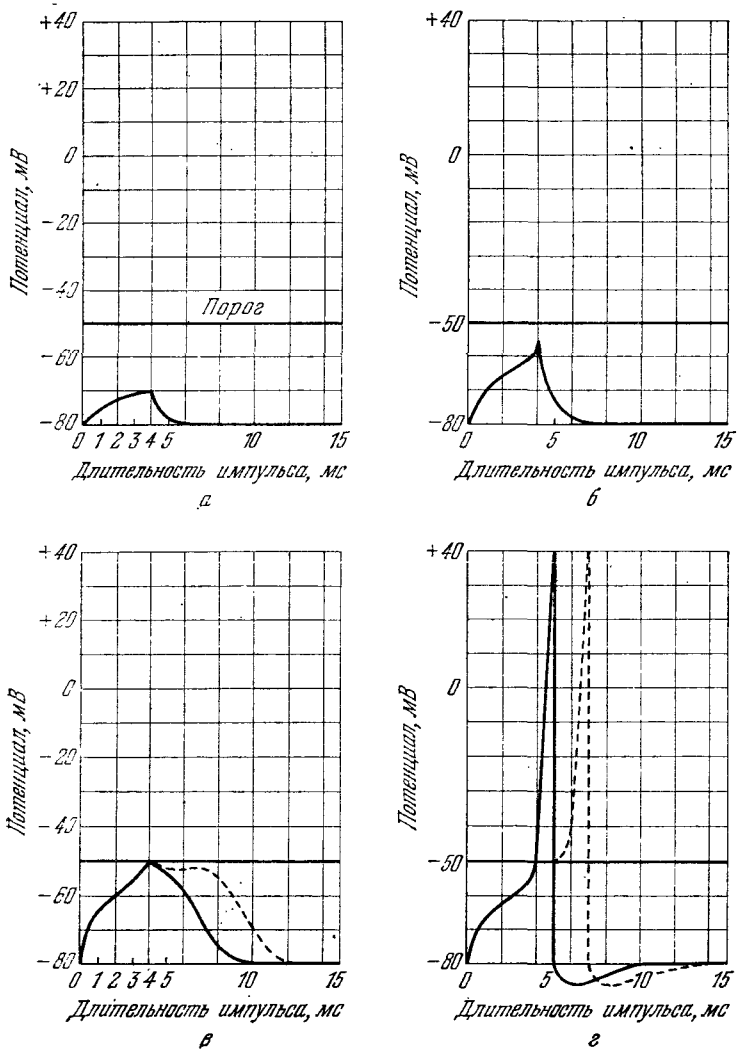


Рис. 11.6. Возбуждение мембраны аксона: *а* и *б* — подпороговые импульсы, *в* — пороговый затухающий импульс, *г* — появление потенциала действия при надпороговом импульсе; штриховыми линиями показан перемещающийся импульс

мерно — 50 мВ, а потенциал действия равен 40 мВ. Это изображено схематически на рис. 11.6.

Прохождение импульса определяется изменением состояния мембраны аксона при ее стимуляции. Как уже говорилось, в состоянии покоя клеточной мембраны в результате активного

Таблица 11.1. **Концентрация ионов и других веществ в аксоне кальмара *Loligo***

Вещество	Концентрация, ммоль на 1 кг H_2O			Вещество	Концентрация, ммоль на 1 кг H_2O		
	Аксоплазма	Кровь	Морская вода		Аксоплазма	Кровь	Морская вода
K^+	400	20	10	Глутаминовая кислота	12	—	—
Na^+	50	440	460	Янтарная и фумаровая кислоты	17	—	—
Cl^-	40—150	560	540				
Ca^{2+}	0,4	10	10				
Mg^{2+}	10	54	53	Ортофосфат	2,5—9,0	—	—
Изэтионовая кислота	250	—	—	АТФ	0,7—1,7	—	—
Аспарагиновая кислота	75	—	—	Аргининфосфат	1,8—5,7	—	—
				Вода	865	870	966

транспорта ионов концентрация ионов K^+ в цитоплазме (аксоплазме) значительно превосходит их концентрацию во внешней среде, а для ионов Na^+ ситуация противоположна. В табл. 11.1 приведен состав аксоплазмы аксонов *Loligo*, состав плазмы крови и близкий к нему состав морской воды.

При наложении на мембрану стимулирующего потенциала вначале увеличивается ее проницаемость для ионов Na^+. Ионы Na^+ входят в аксон, в результате чего внутренняя поверхность мембраны изменяет знак своего заряда с отрицательного на положительный. Иными словами, происходит *деполяризация* мембраны.

Если воспользоваться для выражения разности потенциалов формулой (10.23)

$$\varphi \equiv \Delta\psi = \frac{RT}{\mathscr{F}} \ln \frac{P_K c_K^i + P_{Na} c_{Na}^i + P_{Cl} c_{Cl}^e}{P_K c_K^e + P_{Na} c_{Na}^e + P_{Cl} c_{Cl}^i}, \qquad (11.2)$$

то состояние покоя охарактеризуется отношением ионных проницаемостей

$$P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 0{,}04 : 0{,}45.$$

В состоянии возбуждения, отвечающем генерации потенциала действия,

$$P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 20 : 0{,}45.$$

Подчеркнем, что толкование возбуждения как результата изменения ионных проницаемостей является феноменологическим и не раскрывает молекулярный механизм процесса.

При деполяризации мембраны возникают токи, замыкающиеся через наружную проводящую среду. Эти токи возбуждают следующий участок аксона (рис. 11.7).

Таким образом, согласно мембранной теории, при генерации импульса открывается некий канал, сквозь который ионы Na^+

Рис. 11.7. Электрические токи, возникающие при деполяризации мембраны аксона

проникают внутрь аксона, вызывая деполяризацию мембраны. Во время генерации импульса натриевый канал закрывается и открывается калиевый канал. Ионы K^+ выходят наружу, что приводит к восстановлению отрицательного заряда на внутренней стороне мембраны. Происходит *реполяризация* мембраны. После прохождения рефрактерного периода мембрана аксона приобретает способность передать новый импульс (рис. 11.8).

Как видно из рис. 11.7, суммарный продольный ток через сечение аксона и окружающую среду равен нулю — в любом месте внутренние токи равны по силе и противоположны по направлению наружным. Но плотность продольного тока и продольная разность потенциалов между двумя точками внутри аксона отличны от таковых снаружи. Мембрана аксона имеет сопротивление 1000 Ом · см^2, емкость 1 мкФ/см^2, что соответствует бимолекулярному липидному слою толщиной в 5 нм с диэлектрической проницаемостью $\varepsilon = 5$ и удельным сопротивлением $2 \cdot 10^9$ Ом · см. Во время генерации импульса проводимость мембраны увеличивается примерно в 10^3 раз. Можно моделировать электрические свойства мембраны эквивалентной схемой, показанной на рис. 11.9. Рисунок изображает лишь один элемент мембраны, и следует представить себе длинную линейную последовательность таких элементов, образующих непрерывный кабель. Сопротивление R характеризует аксоплазму, наружный раствор имеется в большом избытке и изображается проводником без сопротивления. Натриевая и калиевая «батареи» $\mathscr{E}_{Na}$ и $\mathscr{E}_K$ определяют генерацию импульса, добавочная «батарея» $\mathscr{E}_Y$ изображает движение других ионов, не изменяющееся при возбуждении.

Таким образом, распространение импульса представляет собой самоподдерживающийся процесс, подобный горению бикфордова шнура.

Как уже сказано, распространение импульса в миелинизированном волокне происходит быстрее, чем в немиелинизированном. В миелинизированном аксоне проведение импульса является *сальтаторным*, т. е. происходит путем перескока импульса от одного перехвата Ранвье к другому. Калиевые и натриевые каналы открываются и закрываются только в перехватах Ранвье — миелинизированные участки хорошо изолированы. Миелин имеет малую емкость, чем и объясняется большая скорость проведения импульса. Схема сальтаторного проведения импульса показана на рис. 11.10.

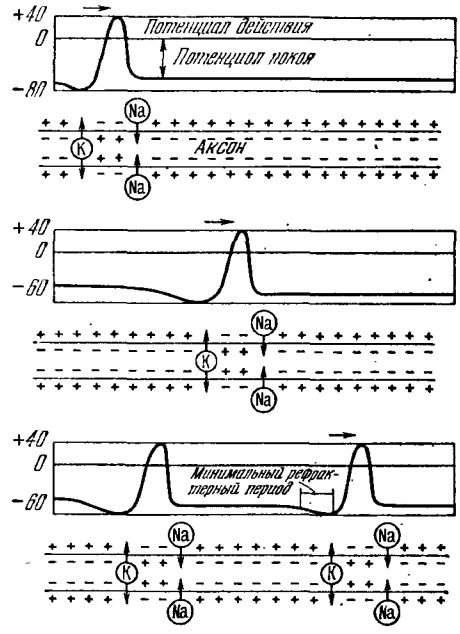


Рис. 11.8. Распространение нервного импульса определяется изменением ионной проницаемости мембраны аксона

Миелинизация, свойственная аксонам позвоночных, обеспечила им эволюционное преимущество, так как при той же скорости проведения импульса миелинизированное волокно может быть в 25 раз тоньше немиелинизированного.

Мембранная теория непосредственно подтверждается опытами с перфузией аксонов. Оказалось возможным выдавить аксоплазму из гигантского аксона *Loligo* без повреждения мембраны и заменить аксоплазму искусственным раствором. Перфузированные аксоны способны проводить до 10^5—10^6 импульсов в течение нескольких часов.

Потенциал покоя исчезает при равенстве наружной и внутренней концентраций K^+. При замене в аксоплазме KCl на NaCl потенциал покоя падает до нуля. В то же время потенциал покоя мало чувствителен к концентрациям K^+, меньшим 20 мМ. Перфузионные опыты показывают, что потенциал покоя действительно регулируется ионами K^+. При замене KCl на NaCl и значительном увеличении концентрации K^+ (до 600 мМ) создается положение, обратное нормальному, и внутренняя часть волокна заряжается положительно, а не отрицательно по отношению к внешней среде. И в самом деле, при заполнении волокна, погруженного в изотонический раствор KCl, таким же раствором

NaCl внутренний раствор заряжен положительно по отношению к наружному и φ составляет 50—60 мВ.

Прямые опыты с мечеными атомами показывают, что проведение импульса связано с возрастанием скорости движения калия и натрия по градиентам концентрации. В гигантском аксоне каракатицы *Sepia* при каждом импульсе наблюдается входящий поток Na^+, равный $10{,}3 \cdot 10^{-12}$ моль/см², и выходящий поток $6{,}6 \times \times 10^{-12}$ моль/см². Чистый вход Na^+ ($3{,}7 \times \times 10^{-12}$ моль/см²) за импульс примерно равен выходу K^+. Действительно, для изменения напряжения конденсатора емкостью 1 мкФ на 120 мВ нужен заряд $0{,}12 \cdot 10^{-6}$ Кл, что эквивалентно $1{,}3 \cdot 10^{-12}$ моль/см² одновалентного катиона. Таким образом, измеренный вход Na^+ более чем достаточен для возникновения потенциала действия.

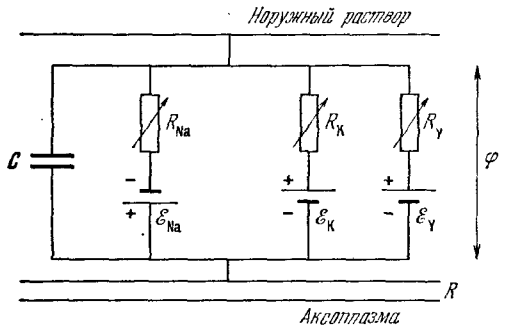


Рис. 11.9. Эквивалентная схема элемента возбудимой мембраны нервного волокна

За один импульс в немиелинизированном аксоне через 1 мкм² поверхности проходит около 20 000 ионов Na^+. В миелинизированном аксоне за один импульс через каждый перехват Ранвье входит $6 \cdot 10^6$ ионов Na^+. Площадь мембраны в перехвате равна 20 мкм², следовательно, через 1 мкм² проходит 300 000 ионов Na^+.

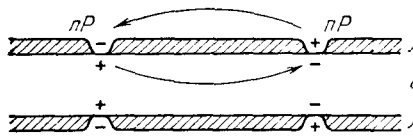


Рис. 11.10. Схема сальтаторного проведения импульса: *пР* — перехват Ранвье, *м* — миелин, *а* — аксоплазма

Плотность ионного тока в перехвате примерно в 10 раз больше, чем в немиелинизированных гигантских аксонах.

При генерации импульса в нерве происходят тепловые явления — сначала он нагревается, потом охлаждается. Показано, что этот аффект определяется тремя слагаемыми. Во-первых, во время генерации потенциала действия происходит диссипация энергии, вызванная потоками ионов. Во-вторых, в то же время происходит диссипация вследствие изменения разделенных зарядов на двух сторонах мембраны — понижение трансмембранного потенциала отвечает выделению тепла. Этот вклад, однако, на порядок меньше ионного. Наконец, переход ионного канала из замкнутого в открытое состояние сопровождается выделением тепла, далее поглощаемого. Теория в общем согласуется с опытом, который дает для вагуса кролика выделение тепла, равное 100, и последующее поглощение — 93 мкДж/г на импульс.

§ 11.2. Распространение нервного импульса

Известны сравнительно простые электрохимические процессы, сходные с движением нервного импульса. В частности, такой процесс происходит при погружении железной проволоки в концентрированную азотную кислоту. На поверхности проволоки образуется пассивирующая пленка окисла. Если разрушить пленку в каком-нибудь месте, то идет бурное растворение железа. Этот процесс распространяется вдоль проволоки, движется фронт *активации*, за *которым следует репассивация железа*. Это модель, тщательно изученная Лилли, а также Маркиным. Теория показывает далеко идущую формальную аналогию между моделью Лилли и распространением нервного импульса. Имеются и другие модели.

Нервное возбуждение начинается с локальной генерации потенциала действия. Далее импульс распространяется по нервным аксонам и по *синцитиям*, т е. по системам, состоящим из многих волокон, причем импульс может переходить с одного волокна на другое. Синцитиальное строение свойственно гладким мышцам, выстилающим полые органы животных. Нервное возбуждение переходит от одного нейрона к другому посредством синаптической передачи, природа которой представляет особую проблему.

Прежде чем рассмотреть генерацию импульса, определяемую физико-химическими процессами в активной мембране, обратимся к физической трактовке распространения импульса.

Для всей области особенно важны работы Ходжкина и Хаксли, в которых решалась вся проблема теоретического расчета — как формы потенциала действия, так и скорости распространения импульса.

Исходное уравнение для мембранного тока, возникающего в однородном участке в ответ на сдвиг потенциала, можно написать в виде

$$I = C\frac{d\varphi}{at} + I_i, \qquad (11.3)$$

где φ — разность потенциалов между обеими сторонами мембраны аксона, $C\varphi$ — емкостной ток, связанный с изменением плотности ионов на наружной и внутренней поверхностях мембраны, I_i — ионный ток, определяемый движением через мембрану заряженных частиц. В аксоне кальмара I_i состоит из токов ионов Na^+ и K^+ (I_{Na} и I_K) и тока утечки I_v. Ходжкин и Хаксли показали экспериментально, что эти ионные токи линейно зависят от соответствующих электрохимических потенциалов:

$$I_{Na} = g_{Na}(\varphi - \varphi_{Na})$$

и т. д. Теория Ходжкина и Хаксли основывается на раздельном измерении калиевого и натриевого токов. Для этого применяется *метод фиксации напряжения* (voltage clamp). Воспользуемся моделью, показанной на рис. 11.9. Замыкая мембрану металличе-

ской проволокой, можно резко уменьшить мембранный потенциал до нуля. Конденсатор C разряжается, и после этого ток создается лишь ионами, проходящими через R_{Na} и R_K. При резкой деполяризации мембраны до значения потенциала между 20 и 110 мВ общий ионный ток сначала представляет собой входной ток Na^+ по градиенту концентрации. Спустя примерно 1 мс возникает выходной ток K^+. Если общая разность потенциалов равна φ_{Na},

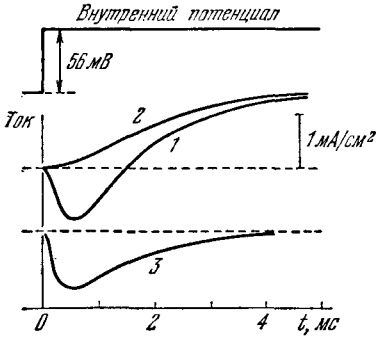


Рис. 11.11. Разделение мембранного тока I на калиевую и натриевую компоненты: $I = I_{Na} + I_K$ (кривая *1*); натрий заменен холином $I = I_K$ (кривая *2*); кривая *3* = кривая *1* — кривая *2*, $I = I_{Na}$. Отклонение вверх — выходящий ток

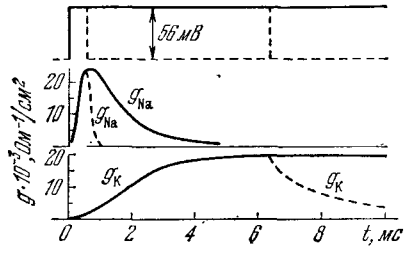


Рис. 11.12. Изменение g_{Na} и g_K при деполяризации мембраны на 56 мВ. Сплошные линии — проводимость при длительной деполяризации, штриховые — проводимость при реполяризации мембраны через 0,6 и 6,3 мс

наблюдается только калиевый ток. При $\varphi > \varphi_{Na}$ натриевый ток направлен наружу. Разделение тока на компоненты можно провести, изменяя концентрации ионов Na^+ и K^+. На рис. 11.11 показаны наблюдаемые кривые $I(t)$. Если аксон погружен в морскую воду, полный ток $I = I_{Na} + I_K$ изображается кривой *1*. При замене Na^+ холином наблюдается чистый калиевый ток — кривая *2*. Разность этих двух кривых (*3*) дает I_{Na}. При быстром смещении потенциала внутри волокна на +56 мВ («короткое замыкание» мембраны) натриевая проводимость g_{Na} сначала быстро растет от нуля до $25 \cdot 10^{-3}$ Ом$^{-1} \cdot$ см$^{-2}$, а затем убывает (рис. 11.12). Калиевая проводимость медленно возрастает, следуя S-образной кривой, и через 5—6 мс достигает постоянного уровня. При реполяризации мембраны g_{Na} убывает значительно быстрее, чем g_K. При различных смещениях мембранного потенциала наблюдается закономерное изменение кривых $g_{Na}(t)$ и $g_K(t)$. Калиевая и натриевая проводимости мембраны аксона существенным образом зависят от присутствия ионов Ca^{2+} (см. § 11.13).

Ходжкин и Хаксли предложили удовлетворительное описание наблюдаемых изменений, исходя из специальной модели. Предполагается, что K^+ может проходить сквозь мембрану, лишь если

к определенному ее участку под влиянием электрического поля подойдут четыре однозарядных частицы. Калиевая проводимость равна

$$g_{\text{K}} = \bar{g}_{\text{K}} n^4, \tag{11.4}$$

где $\bar{g}_{\text{K}}$ — максимальная проводимость, $n < 1$ — вероятность подхода частицы. Кинетическое уравнение для n имеет вид

$$\dot{n} = \alpha_n (1 - n) - \beta_n n, \tag{11.5}$$

где константы скорости α_n и β_n при постоянной концентрации ионов Ca^{2+} зависят только от мембранного потенциала φ. При возрастании положительного потенциала внутри волокна α_n увеличивается, β_n — уменьшается.

Поскольку калиевый канал можно считать открывающимся при подходе отрицательно заряженной частицы, можно трактовать n как вероятность удаления из калиевого канала двух ионов Ca^{2+}.

Следующее предположение состоит в том, что натриевый канал открывается, если одновременно в данный участок попадают три активирующих частицы и удаляется одна блокирующая. Обозначив вероятность прихода активирующей частицы m и вероятность удаления блокирующей частицы h, получаем

$$g_{\text{Na}} = \bar{g}_{\text{Na}} m^3 h. \tag{11.6}$$

Для m и h записываются уравнения, аналогичные (11.5):

$$\dot{m} = \alpha_m (1 - m) - \beta_m m, \tag{11.7}$$

$$\dot{h} = \alpha_h (1 - h) - \beta_h h. \tag{11.8}$$

Когда внутренняя часть аксона становится более положительной, α_m и β_h возрастают, α_h и β_m убывают.

При фиксированном напряжении все α и β постоянны; следовательно, n, m и h экспоненциально зависят от времени. Расчет кривых зависимостей g_{K} и g_{Na} от t и φ по этим формулам дает хорошее согласие с опытом.

Плотность полного мембранного тока дается выражением (ср. (11.3))

$$I = C \frac{\partial \varphi}{\partial t} + (\varphi - \varphi_{\text{K}}) \bar{g}_{\text{K}} n^4 + (\varphi - \varphi_{\text{Na}}) \bar{g}_{\text{Na}} m^3 h + (\varphi - \varphi_{\text{Y}}) \bar{g}_{\text{Y}}, \tag{11.9}$$

где C — емкость мембраны на единицу площади. Первый член (11.9) — емкостной ток, $\bar{g}_{\text{Y}}$ — проводимость для Cl^- и других ионов, отвечающая утечке.

Вызовем потенциал действия коротким импульсом. После окончания раздражения и радиальный, и продольный токи на данном участке аксона равны нулю. Следовательно, $I = 0$ для $t > 0$. Зависимость $\varphi(t)$ находится из (11.9), если взять в качестве граничного условия начальное значение φ. Теория дает хорошее согласие с опытом (рис. 11.13).

Рассмотрим некоторый участок аксона длиною l. Радиус аксоплазмы равен a, ее сопротивление R_a. В стационарном состоянии ток, втекающий в рассматриваемый участок, равен нулю. Имеем

$$\frac{\pi a^2}{R_a}\left[-\frac{\partial\varphi}{\partial x}+\left(\frac{\partial\varphi}{\partial x}+\frac{\partial^2\varphi}{\partial x^2}\,l\right)\right]=2\pi alI, \qquad (11.10)$$

где I дается уравнением (11.9). В левой части (11.10) фигурирует дивергенция продольного тока, справа мембранный ток. Если импульс распространяется с постоянной скоростью v, то справедливо волновое уравнение

$$\frac{\partial^2\varphi}{\partial x^2}=\frac{1}{v^2}\frac{\partial^2\varphi}{\partial t^2} \qquad (11.11)$$

и из (11.9)—(11.11) следует *уравнение Ходжкина — Хаксли:*

$$\frac{a}{2Rv^2}\frac{d^2\varphi}{dt^2}=$$

$$=C\frac{d\varphi}{dt}+(\varphi-\varphi_K)\bar{g}_K n^4+(\varphi-\varphi_{Na})\bar{g}_{Na}m^3h+(\varphi-\varphi_Y)\bar{g}_Y. \qquad (11.12)$$

Численное решение (11.12), отвечающее конечным значениям φ, дает скорость v, хорошо совпадающую с опытной. Так, для аксона кальмара скорость, вычисленная с помощью опытных значений a, R_a, C, φ_K, φ_{Na}, φ_Y, $\bar{g}_K$, $\bar{g}_{Na}$, $\bar{g}_Y$, равна 18,8 м/с. Эксперимент дает 21,2 м/с. При этом значении v потенциал после окончания спайка возвращается к уровню покоя.

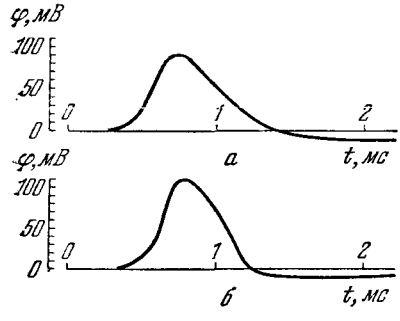


Рис. 11.13. Распространяющиеся потенциалы действия: *а* — теория, *б* — опыт (аксон кальмара при 18,5 °С)

В ходе дальнейших исследований удалось разделить и упростить задачу. При расчете скорости распространения импульса можно отвлечься от его точной формы и рассмотреть движение импульса по электрическому кабелю, образуемому мембраной аксона и характеризуемому определенными значениями сопротивления и емкости. Индуктивность волокна существенной роли не играет. Соответствующие подходы реализованы, в частности, в работах Компанейца (1966, 1971).

При распространении импульса можно различать четыре фазы. Во-первых, разность потенциалов возрастает от своего значения в покое φ_0 до порогового значения φ_1. Во-вторых, она возрастает с φ_1 до φ_{max} — до потенциала действия. Затем система возвращается к исходному значению φ_0 и, наконец, переходит в рефрактерное состояние. Скорость распространения одиночного

импульса определяется лишь первыми двумя фазами, в которых потенциал нарастает. Задавшись прямоугольным начальным импульсом тока и учитывая значения емкости и сопротивления на единицу длины аксона и его радиус, удается вычислить скорость

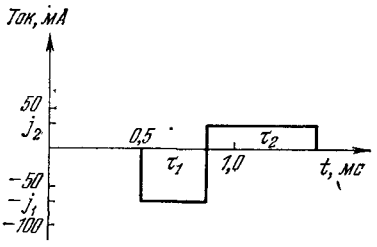


Рис. 11.14. Аппроксимация ионного тока при возбуждении мембраны

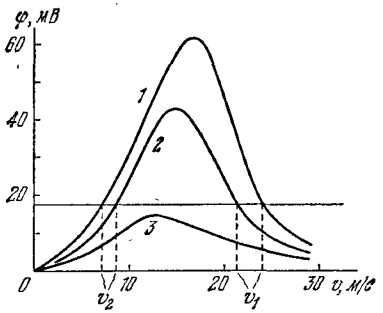


Рис. 11.15. Скорость распространения импульса при различных проводимостях утечки $\bar{g}_Y$: кривая *1* — 0; *2* — 1; *3* — 5,74 Ом$^{-1}$·см$^{-2}$

распространения как в немиелинизированном, так и в миелинизированном аксонах в разумном согласии с опытом. Полученные зависимости скорости от названных параметров следуют и непосредственно из соображений размерности.

Дальнейшее развитие теории распространения импульса дано в работах Маркина, Чизмаджева и др. (1969—1974).

Распространение возбуждения по немиелинизированному однородному волокну описывается общим уравнением

$$\frac{\partial \varphi(x, t)}{\partial t} = \frac{1}{RC} \frac{\partial^2 \varphi(x, t)}{\partial x^2} - \frac{I}{C}, \qquad (11.13)$$

где φ — потенциал мембраны, отсчитываемый от потенциала покоя, R — сумма внешнего и внутреннего сопротивлений, C — емкость единицы длины волокна, I — ионный ток, текущий через мембрану (также отнесенный к единице длины волокна); $I > 0$, если ток течет наружу.

Сразу по достижении порога ионный ток течет внутрь волокна, а спустя некоторое время меняет направление и течет наружу. Можно аппроксимировать ионный ток двумя прямоугольными «столиками» (рис. 11.14). В этом приближении уравнение (11.13) решается без особых затруднений. Вводится координата $\xi = x - vt$, где v — скорость распространения импульса. Уравнение (11.13) переписывается в виде

$$\frac{d^2\varphi(\xi)}{d\xi^2} + vRC \frac{d\varphi(\xi)}{d\xi} - RI(\xi) = 0. \qquad (11.14)$$

Находятся волновые решения при условии $\varphi(\infty) = 0$ и конечности φ при $\xi \to -\infty$. Уравнению (11.14) удовлетворяют два решения с различными значениями v. На рис. 11.15 показаны кривые зависимости порога возбуждения φ' от v для трех значений проводимости утечки $\bar{g}_Y$. Для аксона кальмара приняты параметры (см. рис. 11.14): $j_1 = 63$ мкА, $j_2 = 40$ мкА, $\tau_1 = 36$ мс, $\tau_2 = 0{,}55$ мс ($j_1\tau_1 = j_2\tau_2$), $C = 0{,}157$ мкФ/см, удельное сопротивление аксоплазмы $\rho = 50$ Ом·см, диаметр аксона $a = 0{,}05$ см, $\varphi' = 18{,}5$ мВ. Прямая

$\varphi' = 18{,}5$ мВ пересекает кривую $\varphi'(v)$ в двух точках при достаточно малых значениях $\bar{g}_Y$. Бо́льшая (v_1) и меньшая (v_2) скорости примерно равны

$$v_1 \approx \frac{j_1/(\varphi' RC^2) - 2/(r_m RC)}{[j_1/(\varphi' RC^2) - 1/(r_m RC)]^{1/2}}, \tag{11.15}$$

$$v_2 \approx \left[\frac{2\varphi'}{Rj_1\tau_1(\tau_1 + \tau_2)}\right]^{1/2}. \tag{11.16}$$

Здесь r_m — сопротивление мембраны единицы длины аксона в состоянии покоя. Так как $j_1 \sim a$, $R \sim a^{-2}$, $C \sim a$, получаем $v \sim a^{1/2}$, что согласуется с опытом.

Решение v_1 устойчиво, v_2 — неустойчиво. Пусть скорость v_1 возросла на малую величину. Тогда, как видно из рис. 11.15, потенциал в средней точке импульса уменьшится и окажется ниже порогового значения φ'. В результате импульс замедлится. Если же v_1 уменьшится, то потенциал в передней точке будет превосходить порог и импульс ускорится. Для v_2 справедливы обратные соотношения.

С учетом опытных значений параметров для аксона кальмара ($r_m = 6{,}37 \cdot 10^3$ Ом·см) в прекрасном согласии с опытом получается $v_1 = 21$ м/с.

Теория показывает, таким образом, что скорость распространения импульса определяется электрическими и геометрическими параметрами аксона, практически независимо от формы исходного импульса. Теория дает решения и для волокон переменного сечения, для ветвящихся волокон. Теми же авторами развита теория взаимодействия нервных волокон в пучках и стволах, теория распространения возбуждения в синцитиях.

Нервное волокно представляет собой *возбудимую*, или *активную*, *среду*. Распространение нервного импульса представляет собой распространение *автоволны* — сильно нелинейного образования, поскольку ее движение описывается нелинейными уравнениями типа (11.13). Скорость, форма и амплитуда импульса не зависят от начальных условий; они, как мы видели, определяются свойствами среды. До и после прохождения автоволны участок волокна находится в состоянии покоя — автоволна локализована. Этим она отличается от обычной электромагнитной или звуковой волны.

Автоволна отлична и от *солитона* — отдельной, не диссипирующей волны в нелинейной среде. Характеристики солитона зависят от начальных условий. При столкновении два солитона проходят друг через друга, не изменяясь. Напротив, автоволны сильно взаимодействуют, гася друг друга.

Строгий анализ показывает, что уравнения, описывающие распространение солитона, неприменимы к биологическим активным средам.

§ 11.3. Генерация импульса

Вольт-амперная характеристика мембраны аксона своеобразна. Она не только нелинейна, но и содержит участок с отрицательным наклоном (рис. 11.16, *а*). Это следствие зависимости Na- и K-проводимости от потенциала на мембране.

Рассмотрим возникновение потенциала действия в однородном участке аксона. Так как на первом этапе деполяризации К-проводимость очень мала, считаем ионный ток суммой I_{Na} и тока утечки I_y. Ток утечки выражается по закону Ома как разность потенциала ψ и потенциала покоя ψ_0, деленная на сопротивление мембраны:

$$I_y = (\psi - \psi_0)/R \equiv \varphi/R.$$

Зависимость I_{Na} от времени аппроксимируем прямоугольной ямой, считая, что ток с постоянным значением I_{Na} существует в интервале времени от момента достижения его пикового значения t^* до момента спада Na-тока t_2. В остальное время $I_{Na} = 0$.

Опыты при фиксированном потенциале показывают, что зависвмость $I_{Na}(\varphi)$ нелинейна, т. е. нелинейна зависимость $g_{Na}(\varphi)$. Однако при мгновенном скачке потеициала проводимость g_{Na} не успевает измениться и, согласно опытам Ходжкина и Хаксли, I_{Na} линейно зависит от $\varphi - \varphi_{Na}$:

$$I_{Na} = g_{Na}(\varphi - \varphi_{Na}). \qquad (11.17)$$

Заменим экспериментальную кривую $I_{Na}(\varphi)$, показанную на рис. 11.16, *а*, ломаной линией с дискретными абсолютными значениями проводимости (рис. 11.16, *б*):

$$\left|\frac{dI_{Na}}{d\varphi}\right| = \begin{cases} g_1 & \text{при } \varphi_1 < \varphi < \varphi_2, \\ g_2 & \text{при } \varphi > \varphi_2. \end{cases} \qquad (11.18)$$

Вольт-амперную характеристику пикового Na-тока опишем формулами

$$I_{Na} = \begin{cases} 0, & \varphi < \varphi_1, \\ -g_1(\varphi - \varphi_1), & \varphi_1 < \varphi < \varphi_2, \\ -g_2(\varphi - \varphi_2'), & \varphi_2' < \varphi < \varphi_3, \\ g_2(\varphi - \varphi_{Na}), & \varphi > \varphi_3, \end{cases} \qquad (11.19)$$

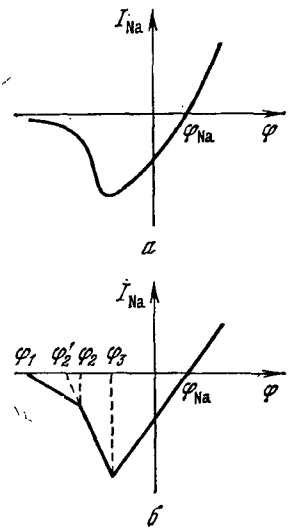


Рис. 11.16. Экспериментальная вольт-амперная характеристика (а) и ее аппроксимация ломаной линией (б)

причем $g_1 < g < g_2$, где $g = R^{-1}$. При возбуждении мембраны постоянным током от источника с напряжением $\tilde{\varphi}$ имеем $I = g\tilde{\varphi}$. Рассмотрим ответ мембраны на такое раздражение.

Если $\tilde{\varphi} < \varphi_1$, то $I_{Na} = 0$. Уравнение для мембранного тока $I_m = C\,\partial\varphi/\partial t + I_y$ принимает вид

$$C\frac{d\varphi}{dt} = g(\tilde{\varphi} + \varphi_0 - \varphi). \qquad (11.20)$$

Его решение

$$\varphi - \varphi_0 = \tilde{\varphi}[1 - \exp(-gt/C)] \qquad (11.21)$$

описывает пассивное поведение мембраны при подпороговых стимулах. Стимул $\tilde{\varphi} = RI$ определяет предел, до которого растет φ. Если в момент $t = t_0$ стимулирующий ток выключается, то

$$C\frac{d\varphi}{dt} = g(\varphi_0 - \varphi) \qquad (11.22)$$

с начальным условием

$$\varphi(t_0) = \varphi_0 + \tilde{\varphi}[1 - \exp(-gt_0/C)].$$

Решение дает быстро спадающее напряжение

$$\varphi - \varphi_0 = \tilde{\varphi}[\exp(gt_0/C) - 1]\exp(-gt/C). \qquad (11.23)$$

Если стимулирующий ток достаточно велик, то наступает момент $t = t_1$ и растущий потенциал достигает значения φ_1. При $t \geqslant t_1$

$$C\frac{d\varphi}{dt} = g\tilde{\varphi} - g(\varphi - \varphi_0) + g_1(\varphi - \varphi_1). \qquad (11.24)$$

Решение (11.24) имеет вид

$$\varphi - \varphi_0 = \tilde{\varphi} + \frac{\tilde{\varphi} - (\varphi_1 - \varphi_0)}{g - g_1}\left\{g_1 - g\exp\left[-\frac{g - g_1}{C}(t - t_1)\right]\right\}. \qquad (11.25)$$

Оно описывает экспоненциальный рост $\varphi - \varphi_0$ до значения

$$\varphi_\infty - \varphi_0 = \tilde{\varphi} + \frac{g_1}{g - g_1}[\tilde{\varphi} - (\varphi_1 - \varphi_0)]. \qquad (11.26)$$

Локальный ответ, определяемый разностью наблюдаемого сдвига потенциала и соответствующего пассивного ответа, находим, вычитая (11.21) из (11.25). Локальный ответ оказывается имеющим S-образную форму, что согласуется с опытом (рис. 11.17).

Исключив с помощью соотношения (11.21) для $t = t_1$

$$\varphi_1 - \varphi_0 = \tilde{\varphi}[1 - \exp(-gt_1/C)]$$

$\exp(-gt_1/C)$ из (11.25), получаем

$$\varphi - \varphi_0 = \tilde{\varphi} + \frac{\tilde{\varphi} - (\varphi_1 - \varphi_0)}{g - g_1}\left[g_1 - g\exp\left(-\frac{g - g_1}{C}t\right)\left(\frac{\tilde{\varphi}}{\tilde{\varphi} - \varphi_1 + \varphi_0}\right)^{\frac{g - g_1}{g}}\right]. \qquad (11.27)$$

Зависимость φ от стимула $\tilde{\varphi}$ нелинейна. Кривая $\varphi(\tilde{\varphi})$, показанная на рис. 11.18, совпадает с экспериментальной.

Мы видим, что рассматриваемая полуэмпирическая модель выявляет основные черты локального ответа: S-образную зависимость от времени,

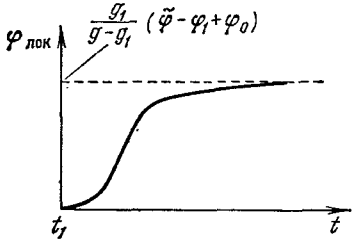


Рис. 11.17. Зависимость локального ответа от времени

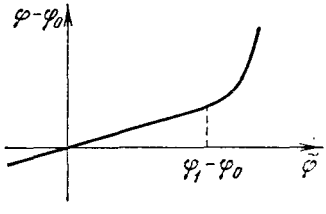


Рис. 11.18. Зависимость сдвига мембранного потенциала от приложенного стимула

нелинейную зависимость от величины стимула. Эти черты обусловлены появлением тока через мембрану, определяемого отрицательной дифференциальной проводимостью, абсолютное значение которой g_1 меньше мембранной проводимости g.

Если предел $\varphi_\infty - \varphi_0$, к которому стремится сдвиг потенциала, превышает φ_2, то система оказывается в области, где Na-ток определяется отри-

цательной дифференциальной проводимостью, причем $g_2 > g$. Так как $g > g_1$, можно считать $g_2 \gg g_1$. Изменение мембранного потенциала описывается уравнением

$$C\frac{d\varphi}{dt} = g\tilde{\varphi} - g(\varphi - \varphi_0) + g_2(\varphi - \varphi_2). \qquad (11.28)$$

При длительном стимуле момент t_2, с которого начинается действие этого уравнения, приходится на участок подъема потенциала, описываемый уравнением (11.25). Решение уравнения (11.28) имеет вид

$$\varphi = -\frac{g}{g_2 - g}(\tilde{\varphi} + \varphi_0) + \frac{g_2}{g_2 - g}\varphi_2 + \\ + \left[\varphi(t_2) + \frac{g}{g_2 - g}(\tilde{\varphi} + \varphi_0) - \frac{g_2}{g_2 - g}\varphi_2\right]\exp\left[\frac{g_2 - g}{C}(t - t_2)\right]. \qquad (11.29)$$

Показатель экспоненты положителен; φ растет или убывает в зависимости от знака предэкспоненты. Если к моменту t_2 потенциал равен $\tilde{\varphi}_2$, то предэкспоненциальный множитель положителен при условии $\tilde{\varphi} > \varphi_2 - \varphi_0$.

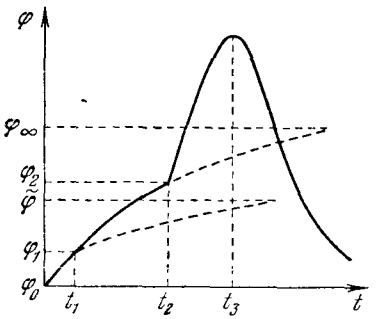


Рис. 11.19. Развитие мембранного потенциала при длительном возбуждении током надпороговой величины: t_1 — момент начала локального ответа, t_2 — момент включения Na-тока, t_3 — момент выключения Na-тока

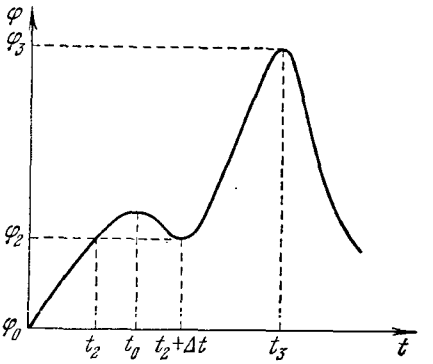


Рис. 11.20. Развитие мембранного потенциала при возбуждении импульсом постоянного тока

Потенциал растет вплоть до момента $t = t_3$, когда вследствие инактивации мембраны Na-ток падает. Если к этому времени прекратилось действие стимула, то поведение системы описывается уравнением

$$C\frac{d\varphi}{dt} = -g(\varphi - \varphi_0)$$

с решением

$$\varphi - \varphi_0 = [\varphi(t_3) - \varphi_0]\exp\left[-\frac{g}{C}(t - t_3)\right].$$

Потенциал падает экспоненциально до уровня потенциала покоя φ_0. Весь ход $\varphi(t)$ представляется кривой рис. 11.19.

При малой длительности стимула t_0 ситуация иная. Пусть действие стимула прекращается еще на изотоническом этапе развития мембранного

потенциала. К моменту t_2 потенциал $\varphi = \varphi_2$, но Na-ток не включается, пока не пройдет некоторый отрезок времени Δt. Но за это время действие стимула прекращается и начинается падение потенциала. Если к моменту времени $t = t_2 + \Delta t$ он не станет меньше φ_2, т. е.

$$\varphi(t_2 + \Delta t) = \varphi_0 + \tilde{\varphi}\left[\exp\left(\frac{g}{C}\, t_0\right) - 1\right] \exp\left[-\frac{g}{C}\,(t_2 + \Delta t)\right] \geqslant \varphi_2, \quad (11.30)$$

то включается Na-ток, дающий спайк, и наблюдается картина развития потенциала, показанная на рис. 11.20.

Из уравнения (11.30) можно получить соотношение между силой тока I и длительностью его действия, согласующееся с опытом количественно.

На основе принятой модели показано, что развитие спайка на мембране аксона начинается с того момента, когда мембранный потенциал достигает значения, при котором проводимость отрицательна и превышает по абсолютной величине проводимость мембраны.

§ 11.4. Ионные каналы

Изложенные модельные теории генерации импульса являются феноменологическими и не раскрывают соответствующие молекулярные механизмы.

Каким же образом ионы переносятся через мембрану аксона (ср. § 10.6)? Посредством специальных переносчиков или по каналам в мембране? Опыт решает эту альтернативу в пользу каналов.

Установлено, что в мембранах аксонов и мышечных клеток имеются три отдельных транспортных системы — Na^+-, K^+- и Ca^{2+}-каналы. Свойства их сходны друг с другом, что дает основания полагать, что эти каналы возникли в результате эволюции одной исходной системы.

Проницаемость одиночных каналов и их число, приходящееся на единицу поверхности, определяются по связыванию токсинов, блокирующих каналы,— прежде всего *тетродотоксина* и *сакситоксина*, а также с помощью анализа флуктуаций ионных токов. Число каналов, приходящихся на 1 мкм^2 мембраны, составляет несколько сот. Каждый открытый канал имеет проводимость 1—10 пСм. Пропускная способность Na^+-канала $\sim 10^7$ ионов в 1 с, K^+-канала $\sim 10^6$ ионов в 1 с. Схема строения канала, согласно современным представлениям, показана на рис. 11.21. Роль канала выполняет макромолекула некоего белка, создающая пору в двухслойной липидной мембране. У входа в канал снаружи имеется узкий селективный фильтр для ионов, у внутренней, выходной стороны расположены так называемые «*ворота*», управляемые конформационно-лабильным *сенсором*. Изменение конформации этой части белка контролируется внутримембранным электрическим полем. Сенсор открывает или закрывает «ворота». Для поведения системы определяющую роль играют электростатические заряды. Внутренняя поверхность канала, по-видимому, выстлана гидрофильными группами, благодаря чему канал проницаем для ионов. Можно думать, что для функционирования канала существенны и конформационные события в билипидной части мембраны — кинки (см. с. 339).

Схема эта гипотетична, так как «канальные белки» до сих пор не выделены и не исследованы. Тем не менее эта схема согласуется с опытными фактами. Ионный канал можно трактовать как своего рода «векторный фермент», катализирующий перенос иона. Активность этого фермента регулируется электрическим полем.

Ионные каналы высоко селективны. Можно, однако, заблокировав K-каналы тетраэтиламмонием, заставить Na-каналы переносить другие катионы. Можно проделать это и с K-каналами. В табл. 11.2 приведены относительные проницаемости каналов для различных катионов. Таблица демонстрирует селективность каналов. Сечение Na-каналов, определяемое из этих данных, примерно $0{,}3 \times 0{,}5$ нм^2. Наблюдаются большие различия проницаемостей для ионов близких размеров. Гидроксиламин $H_3N^+ - OH$ и гидразин $H_3N^+ - NH_2$ проходят сквозь Na-канал, а метиламин $H_3N^+ - CH_3$ не проходит. Хилле считает, что в наиболее узкой части канала имеются атомы кислорода, один из которых заряжен отрицательно. Катионы с OH- и NH_2-группами скользят через канал, образуя водородные связи с O^-, группа CH_3 к этому не способна. Ионы проходят через канал один за другим.

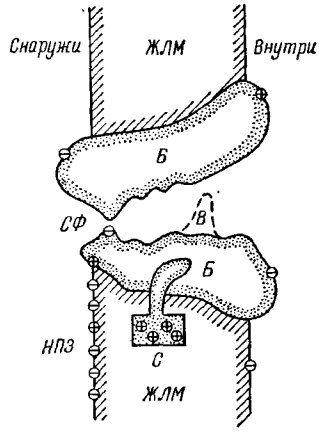


Рис. 11.21. Схема строения ионного канала: *ЖЛМ* — жидкая липидная мембрана, *Б* — белок, *С* — «сенсор», *СФ* — селективный фильтр, *НПЗ* — наружные поверхностные заряды, *В* — «ворота»

Натриевый канал плотно закрывается одной молекулой тетродотоксина (яд из японской рыбы фугу, *Spheroides porphyreus*) или сакситоксина (яд из красного планктона *Gonyaulax*). Соответственно эти яды парализуют нервную проводимость. Пользуясь ими, удалось определить число каналов на единицу поверхности мембраны и изучить «*ток ворот*» (см. далее).

Ходжкин и Хаксли установили экспоненциальную зависимость между начальным изменением мембранного потенциала φ и пиковым значением g_{Na}. Изменению φ на 4—6 мВ в сторону деполяризации отвечает e-кратное повышение g_{Na}. Можно думать, что это изменение есть результат влияния электрического поля на расположение каких-то ионов в канале. Считая, что проводимость g_{Na} пропорциональна доле этих ионов, смещенных полем, получаем

$$g_{Na} = \frac{g_{Na,\,max}}{1 + b \exp(-z\alpha\varphi\mathcal{F}/RT)}, \qquad (11.31)$$

где z — валентность гипотетического иона, α — число, выражающее долю напряжения φ, действующую на ион, b — множитель,

не зависящий от φ. Среднее опытное значение $z\alpha$ по различным данным равно 3,5. Ходжкин и Хаксли предполагали, что эти гипотетические ионы определяют активацию и инактивацию Na- и K-каналов. Предположительно это ионы Ca^{2+}. Действительно, изменение концентрации Ca^{2+} сильно влияет на возбудимость нервных и мышечных клеток. Построена модельная теория, количественно объясняющая форму кривой $g_{Na}(\varphi)$ и смещение этой

Таблица 11.2. **Относительные проницаемости Na- и K-каналов перехватов Ранвье для одновалентных катионов (Хилле, 1972)**

Ион	Кристаллографический радиус иона, нм	$P_{ион}/P_{Na}$ в Na-канале	$P_{ион}/P_{K}$ в K-канале
Литий	0,120	0,93	0,018
Натрий	0,190	1,00	0,010
Калий	0,266	0,09	1,00
Таллий	0,280	0,33	0,300
Рубидий	0,296	—	0,910
Аммоний	0,300	0,16	0,130
Гидроксиламин	0,330	0,94	0,025
Гидразин	0,333	0,59	0,029
Цезий	0,338	—	0,077

кривой при изменении концентрации ионов Ca^{2+}, блокирующих каналы. Предполагается, что в мембране имеются активирующие частицы, способные находиться в двух состояниях A и B, причем переходы $A \rightleftarrows B$ связаны с совершением работы в электрическом поле. Такие переходы могут состоять в перемещении заряженной молекулы, в поворотах диполей или в изменении конформации макромолекулы. В состоянии A частица образует комплекс $A \cdot Ca$ с Ca^{2+}, в состоянии B — способствует прохождению ионов Na^+ по каналу. Модель отвечает схеме

$$A \cdot Ca \rightleftarrows Ca^{2+} + A \rightleftarrows Ca^{2+} + B.$$

Решение соответствующих кинетических уравнений дает

$$\ln [Ca^{2+}] - \frac{z\alpha\varphi\mathcal{F}}{RT} = \text{const}, \qquad (11.32)$$

и величина $\Delta\varphi$ при e-кратном изменении концентрации Ca^{2+} равна $RT/(z\alpha\mathcal{F})$, что дает 7 мВ при $z\alpha = 3{,}5$ в хорошем согласии с опытом.

На основе сходных представлений удается рассмотреть и инактивацию мембраны.

Опыт показывает, что при изменении проводимости мембраны аксона, при ее возбуждении, действительно происходят структурные изменения. Наблюдались изменения рассеяния света (Коген, Хилле, Кейнес), флуоресценции (Тасаки и др.), двулучепреломления мембраны (Берестовский), вызванные изменением φ. Свойства отдельных каналов изучены Ермишкиным.

Прямые доказательства перемещения заряженных частиц, входящих в структуру мембраны, под действием поля были получены Армстронгом и Безанилья.

Структурная перестройка канала при изменении внешнего электрического поля проявляется в наличии «*тока ворот*». Измерения проводились на аксонах, в которых внутренняя среда замещалась бескалиевым раствором, а из внешнего раствора удалялись ионы натрия. Проводимость каналов подавлялась тетродотоксином. Для усреднения больших флуктуаций использовался накопитель. Опыт состоял в том, что к волокну, предварительно гиперполяризованному до −90 или −100 мВ, прикладывался положительный прямоугольный импульс. В начале и в конце импульса наблюдались переходные токи, направленные наружу и внутрь аксона. Для учета тока заряжения емкости аналогичные измерения проводились для отрицательного импульса напряжения. Результаты первого и второго опытов складывались алгебраически. Таким способом выделялась малая асимметричная компонента тока смещения — ток ворот. Этот ток зависит от времени экспоненциально, его время релаксации близко к времени релаксации переменной m в модели Ходжкина — Хаксли (с. 370). Поэтому можно думать, что ток ворот действительно связан с частицами, открывающими и закрывающими Na-канал. Были получены и другие факты, подтверждающие это положение.

Конформационные изменения канала под действием электрического поля или химических медиаторов называют воротными; как уже сказано, они регулируют прохождение ионов — «*ток ворот*». Эти изменения происходят за время от 30 мкс до 10 мс. Они имеют стохастический характер. Суть модели Ходжкина — Хаксли состояла в том, что для активации каждого Na^+-канала в процессе деполяризации необходимы три «воротные m-частицы»; для инактивации нужна одна «воротная h-частица». Можно показать, что эта модель эквивалентна наличию восьми различающихся конформационных состояний Na^+-каналов и пяти состояний K^+-каналов. Только одно из восьми состояний Na^+-канала является проводящим. Однако эта модель остается феноменологической, и имеются данные, ей противоречащие.

Измерение воротного тока производится следующим образом. Ионные токи уменьшают, насколько это возможно. После этого изменяют электрическое поле, чем вызывается внутримембранное перемещение зарядов, и наблюдают ток. Его основная составляющая, по-видимому, относится к активации Na^+-каналов (Кейнес).

Действие поля на воротные механизмы определяется прямым его влиянием на компоненты мембраны. Именно эти компоненты изображены на рис. 11.21 как сенсор.

Из всего сказанного следует, что изучение ионных каналов в мембранах есть одна из важных задач современной биофизики. Многое здесь еще совершенно не ясно.

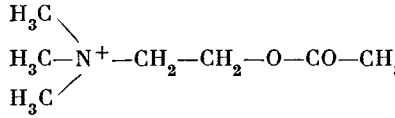
§ 11.5. Синаптическая передача

Когда импульс достигает окончания нервного волокна, он либо производит свое действие в нервно-мышечном, мионевральном соединении, индуцируя мышечное сокращение, либо переходит на другое нервное волокно. И в том, и в другом случае реализуется синаптическая передача импульса. Синапс есть функциональный межмембранный контакт двух возбудимых клеток.

Современная биология располагает богатой информацией о синаптической передаче. Эти данные пока недостаточны для построения молекулярной теории, но позволяют наметить пути ее развития.

Расстояние между пресинаптической и постсинаптической мембранами — *синаптическая щель* — может достигать 15—20 нм. В мионевральном соединении разрыв еще больше — до 50—100 нм. В то же время существуют синапсы с сильно сближенными и даже сливающимися пресинаптической и постсинаптической мембранами. Соответственно реализуются два типа передачи. При больших щелях передача является химической, при тесном контакте возможно прямое электрическое взаимодействие. Здесь мы рассмотрим химическую передачу.

При химической передаче импульс, дошедший до окончания волокна, включает химический механизм, усиливающий электрический сигнал. Такой механизм состоит в освобождении некоторого вещества, *медиатора*, синтезируемого и запасаемого в нервных окончаниях, в его рецепции специфическими центрами постсинаптической мембраны и в изменении ее проницаемости, вследствие чего появляется новый импульс. Медиаторами служат прежде всего *ацетилхолин* (АХ):



и другие родственные соединения. АХ концентрируется в пузырьках пресинаптических окончаний. Пресинаптический механизм представляет собой нейросекрецию, т. е. освобождение АХ из пузырьков под действием нервного импульса. Оценка числа молекул АХ, выделяемых на один импульс, дает несколько миллионов.

В постсинаптической мембране мионеврального соединения установлена высокая концентрация *ацетилхолинэстеразы* (АХЭ) — фермента, катализирующего гидролиз АХ. Показано, что рецепторным веществом является специальный гидрофобный белок. Этот белок был выделен из мембран нервных окончаний. Он имеет большое сродство к АХ и к другим холинэргическим веществам. Де Робертис предложил модель постсинаптической мембраны (рис. 11.22). В мембрану включены дискретные рецепторные

области. Белок-рецептор, имеющий гидрофобную поверхность, проходит сквозь липидные слои мембраны и создает в ней каналы. Стенки канала образованы четырьмя параллельными молекулами белка. АХЭ присутствует как отдельная молекула. АХ присоединяется к активному центру рецепторного белка, расположенному на его внешней поверхности. В результате

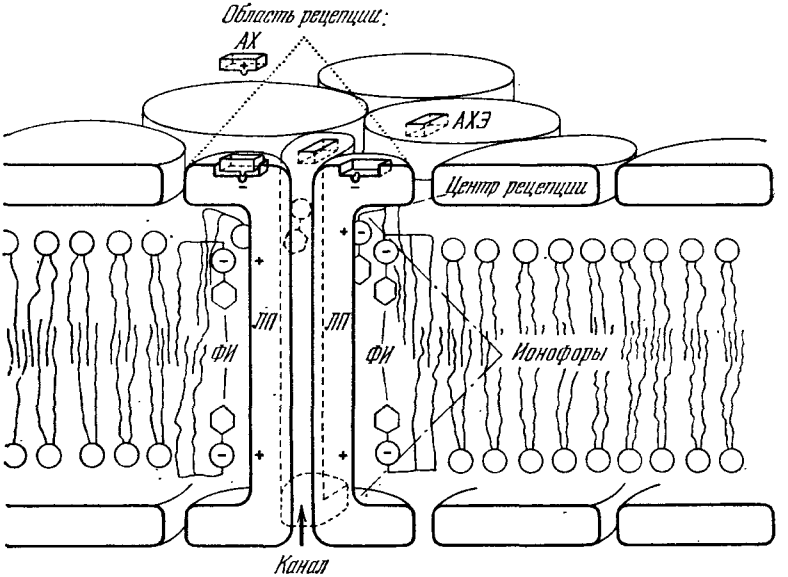


Рис. 11.22. Схема макромолекулярной организации постсинаптической мембраны по де Робертису: *ЛП* — липопротеин, *ФИ* — фосфатидилинозитол

присоединения — сильного ионного взаимодействия — происходят конформационные и трансляционные превращения в мембране, приводящие к изменениям ее ионной проницаемости.

Роль АХЭ состоит в основном в гидролизе АХ. Если бы АХ не гидролизовался, он блокировал бы АХЭ и синаптическая передача прекратилась бы. Так действуют конкурентные ингибиторы АХЭ, в частности, растительный яд кураре и другие алкалоиды. Соответственно блокируется иннервация мышц.

Экспериментально показано, что медиатор — АХ — действительно повышает проницаемость концевой пластины мионеврального соединения для ионов Na^+ и K^+ одновременно и в одинаковой степени. На проницаемость к ионам Cl^- АХ не влияет. Электрический эффект воздействия передатчика подобен кратковременному «проколу» мембраны.

Вернемся в пресинаптическую область. Имеются данные, показывающие, что выделение небольших порций АХ происходит и в покое, независимо от нервного импульса. Импульс очень сильно повышает эту активность за время порядка 1 мс. Спонтанная нейросекреция не обусловлена утечкой АХ из нервных

окончаний путем случайной диффузии. Спонтанная нейросекреция есть квантованное освобождение АХ, при котором порции АХ выделяются в случайные моменты времени по типу «все или ничего» из дискретных точек концевой мембраны аксона. Величина «кванта» АХ не зависит от изменений мембраны, связанных с нервным импульсом. Импульс изменяет в сотни тысяч раз вероятность выделения кванта. Потенциал постсинаптической мембраны, возникающий под влиянием нервного импульса, слагается из большого числа «миниатюрных потенциалов», создаваемых отдельными порциями, «квантами» АХ. Число «квантов», участвующих в реакции в одном мионевральном соединении, зависит от присутствия Ca^{2+} и Mg^{2+}: Ca^{2+} стимулирует секрецию АХ, Mg^{2+} ее ингибирует.

Доказано, что каждая реакция на импульс слагается из целого числа «квантов» АХ, и освобождение одного «кванта» есть событие с очень малой вероятностью ($p \ll 1$). Число импульсов, в которых освобождается x порций («квантов») АХ, должно выражаться законом Пуассона

$$p_x = \frac{m^x}{x!} e^{-m},$$

где $x = 0, 1, 2, \ldots$ — число порций АХ, m — среднее число порций, освобождаемых одним импульсом. В изученной системе

$$m = \frac{\text{Средняя амплитуда реакции}}{\text{Средняя амплитуда спонтанных потенциалов}} = \frac{0{,}933 \text{ мВ}}{0{,}4 \text{ мВ}} = 2{,}33.$$

Совпадение вычисленных и наблюдавшихся значений p_x оказалось превосходным. В частности, согласно закону Пуассона

$$p_0 = \frac{n_0}{N} = e^{-m},$$

где n_0 — число нулевых реакций, равное в рассматриваемой серии 18, N — полное число импульсов, которое равнялось 198;

$$m = \ln \frac{N}{n_0} = \ln \frac{198}{13} = 2{,}4$$

вместо опытного значения 2.33.

«Квантование» выделяемого АХ заставляет думать, что нейросекреция представляет собой кооперативный молекулярный процесс, к рассмотрению которого можно подойти на основе электронно-конформационных взаимодействий. Те же идеи могут оказаться полезными для понимания природы возникновения нового импульса в ответ на воздействие медиатора. Построение соответствующих кинетических моделей — задача реальная, но мы располагаем пока недостаточной информацией о молекулярной структуре синаптических систем.

Проблемы синаптической передачи связаны с исследованием нейронных сетей, посредством которых моделируется высшая нервная деятельность. Существующие модели имеют математи-

ческий, но не физический характер, так как мы не располагаем еще достаточными знаниями об этих явлениях.

Наряду с АХ известны и другие нейромедиаторы. Таковыми являются адреналин, норадреналин, дофамин и некоторые другие вещества. После связывания АХ с рецептором открываются

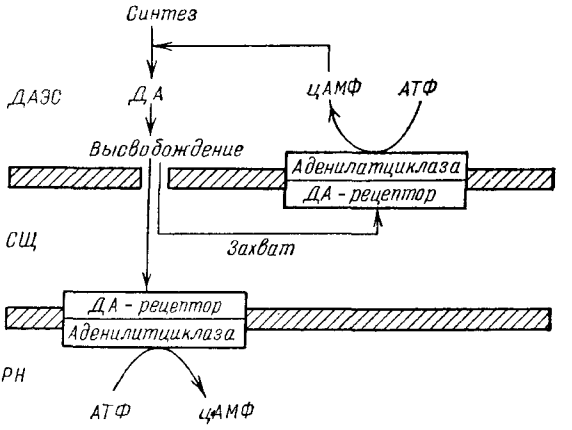
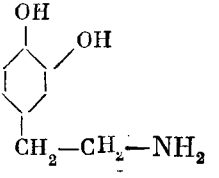


Рис. 11.23. Схема образования цАМФ в синапсах после высвобождения дофамина (*ДА*): *ДАЭС* — дофаминэргический синапс, *СЩ* — синаптическая щель, *РН* — рецепторный нейрон

ионные каналы, через которые ионы Na^+ входят в клетку, а ионы K^+ из нее выходят. Некоторые другие нейромедиаторы не изменяют ионные потоки, а активируют аденилатциклазу, связанную с мембраной. Под действием этого фермента образуется циклическая АМФ, которая активирует протеинкиназу. На рис. 11.23 показана схема образования цАМФ в пост- и пресинаптических участках после высвобождения дофамина, предложенная Натансоном (1977).

Дофамин



играет важную роль в физиологии мозга, его отсутствие приводит к болезни Паркинсона. В то же время имеются предположения о связи шизофрении с избыточным образованием дофамина.

Проблемы синаптической передачи связаны с исследованием нейронных сетей, посредством которых моделируется высшая нервная деятельность. Существующие модели имеют преимущественно математический характер.

В то же время в последние годы из мозга позвоночных были выделены короткие пептиды — *энкефалины* и *эндорфины*, играющие роль нейромедиаторов или нейрогормонов, влияющих на

активность нейронов. Формула Мет-энкефалина

Тир — Гли — Гли — Фен — Мет.

В Лей-энкефалине на месте метионина находится лейцин.

Из нейронов гипоталамуса были выделены другие пептиды, оказывающие стимулирующее или ингибирующее действие на нейроны. Эти так называемые *релизинг-факторы* индуцируют образование второго посредника цАМФ.

Дальнейшее изучение синаптической передачи и химических воздействий на нервные клетки обещает возможность построения молекулярной теории высшей нервной деятельности. Пока что мы такой теорией не располагаем и не имеем реальных представлений о природе памяти и мышления.

Глава 12

МЕХАНОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

§ 12.1. Термодинамика механохимических процессов

В предыдущих главах рассказано, как химическая энергия, запасенная в клетке в молекулах АТФ, трансформируется в осмотическую и электрическую работу. Теперь мы обратимся к механохимическим процессам, в которых химическая энергия преобразуется в механическую работу.

Жизнь невозможна без механического движения. Клетки и организмы выполняют механическую работу, двигаясь как целое и перемещая свои функциональные части в поле тяготения, преодолевая сопротивление воздушной или жидкой среды и т. д. Механическая работа производится в изотермических и изобарических условиях. Тем самым она совершается не за счет тепловой, а за счет химической энергии.

Конформационные превращения белков означают пространственное перемещение атомов, образующих макромолекулы. Если оно происходит в поле внешних сил, то совершается механическая работа. Ее источником может быть свободная энергия, выделяемая в ходе ферментативной реакции. Можно, следовательно, трактовать конформационное превращение белка как механохимический процесс. Однако пока речь идет о ферментативной реакции в растворе, такое толкование не имеет смысла. В любой химической реакции происходит перемещение атомов, но это еще не дает оснований называть реакцию механохимическим процессом.

Говоря о механической работе, мы имеем в виду надмолекулярную, макроскопическую систему. Если молекулы фермента входят в состав такой системы, то при надлежащей ее организации она может осуществлять механическое движение и производить работу за счет свободной энергии ферментативной реакции. Следовательно, рабочие вещества механохимических систем в живых организмах могут быть белками — ферментами. Более того, они должны ими быть. Источник механохимической работы — химическая энергия. Но любые биохимические реакции протекают с непременным участием ферментов. Механохимия живых систем есть ферментативная механохимия.

Механохимический процесс может выполняться циклически работающей машиной, возвращающейся после каждого цикла

в исходное состояние. Переходы рабочих веществ от одного химического потенциала к другому с одновременным производством работы происходят в среде, внешней по отношению к машине. Такой машиной может быть, например, полимерное, полиэлектролитное волокно, длина которого изменяется при изменении pH среды.

Общее изменение внутренней энергии системы

$$dE = T\,dS - dW + \sum_i \mu_i dn_i + \psi\,de + \ldots \qquad (12.1)$$

Здесь dW — работа, производимая системой, dn_i — количество вещества i, введенного из резервуара в систему при химическом потенциале μ_i, $\psi\,de$ — электрическая работа. Ограничимся термическими, механическими и химическими процессами и отвлечемся от $\psi\,de$ и последующих членов уравнения. Будем рассматривать однородное волокно длины l, растягиваемое силой f. Имеем

$$dE = T\,dS - p\,dV + f\,dl + \sum_i \mu_i dn_i. \qquad (12.2)$$

Интегральная форма этого уравнения

$$E = TS - pV + fl + \sum_i \mu_i n_i + \mu_q n_q, \qquad (12.3)$$

где n_q — число молекул, образующих волокно.

Допустим, что имеется лишь одна реагирующая компонента. Тем самым при постоянных p и T система имеет две степени свободы, скажем, f и μ. Можно изобразить рабочий цикл механохимической машины на плоскости f, l. Каждому значению μ будет отвечать кривая $l(f)$, которую можно назвать *изопотенциалом* (подобно изотерме на плоскости p, V для теплового двигателя). Все точки такой кривой могут быть получены из механического опыта, проводимого при постоянном значении μ. Наоборот, кривая $l(f)$ при постоянном значении n подобна адиабате. Такая кривая именуется *изофорой*. На плоскости μ, n изопотенциалы и изофоры представятся прямыми линиями, параллельными осям координат (рис. 12.1). Кривые $\mu(n)$ на такой плоскости можно назвать *изотоническими* при постоянной силе и *изометрическими* при постоянной длине образца.

Цикл на плоскости f, l изображен на рис. 12.2. Работа представится выражением

$$W = -\oint f\,dl = \int_1 \mu\,dn + \int_2 \mu\,dn = (\mu_1 - \mu_2)\,\Delta n, \qquad (12.4)$$

сходным с выражением для работы в цикле Карно

$$W = \oint p\,dV = (T_1 - T_2)\,\Delta S.$$

Существенное отличие состоит в том, что механохимическая машина не может быть охарактеризована коэффициентом полезного

действия, подобным

$$\eta_{\text{терм}} = (T_1 - T_2)/T_1,$$

так как химический потенциал не имеет абсолютного нуля. К. п. д. механохимического процесса можно представить отношением

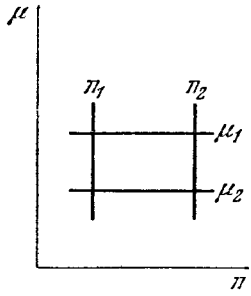


Рис. 12.1. Механохимический цикл на плоскости μ, n

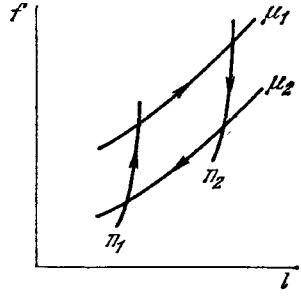


Рис. 12.2. Механохимический цикл на плоскости f, l

работы, полученной в реальном цикле, к работе идеального обратимого цикла

$$\eta' = -\oint f\,dl \Big/ \oint \mu\,dn. \tag{12.5}$$

Перейдем к неравновесной термодинамике. Растяжение полимерного механохимического волокна в изобарическом и изотермическом процессах дает изменение свободной энергии

$$(dG)_{T,\,p} = f\,dl - \mathcal{A}\,d\xi, \tag{12.6}$$

где $\mathcal{A}$ — сродство, ξ — координата химической реакции. Уравнение (12.6) определяет внутреннюю механохимическую силу и сродство

$$f = \left(\frac{\partial G}{\partial l}\right)_{\xi,p,T}, \tag{12.7}$$

$$\mathcal{A} = -\left(\frac{\partial G}{\partial \xi}\right)_{l,p,T}. \tag{12.8}$$

В равновесном состоянии эти величины равны нулю. Имеем

$$\left(\frac{\partial G}{\partial l}\right)_{\xi} = f = \left(\frac{\partial^2 G}{\partial l^2}\right)^{\text{eq}}_{\xi} \delta l + \left(\frac{\partial^2 G}{\partial l\,\partial \xi}\right)^{\text{eq}} \delta\xi = \left(\frac{\partial f}{\partial l}\right)_{\xi} \delta l + \left(\frac{\partial f}{\partial \xi}\right)_{l} \delta\xi,$$

$$\left(\frac{\partial G}{\partial \xi}\right)_{l} = -\mathcal{A} = \left(\frac{\partial^2 G}{\partial \xi\,\partial l}\right)^{\text{eq}} \delta l + \left(\frac{\partial^2 G}{\partial \xi^2}\right)^{\text{eq}}_{l} \delta\xi = -\left(\frac{\partial \mathcal{A}}{\partial l}\right)_{\xi} \delta l - \left(\frac{\partial \mathcal{A}}{\partial \xi}\right)_{l} \delta\xi.$$

Здесь значок eq относится к равновесному состоянию; δl, $\delta\xi$ — отклонения l и ξ от равновесных значений. Из написанных соотношений следует

$$\left(\frac{\partial f}{\partial \xi}\right)_{l} = \left(\frac{\partial^2 G}{\partial \xi\,\partial l}\right)^{\text{eq}} = -\left(\frac{\partial \mathcal{A}}{\partial l}\right)_{\xi}. \tag{12.9}$$

Значит, если $(\partial f/\partial \xi)_l$ отлично от нуля, то сродство $\mathcal{A}$ зависит от длины l.

Качальский и Оплатка построили непрерывную работающую машину, в которой полиэлектролитное волокно (коллаген) попеременно погружается в раствор соли (LiBr) и в чистую воду (рис. 12.3). Работа машины прекращается, когда в результате переноса малых ионов в воду волокном химические потенциалы обоих резервуаров выравниваются. Будучи пущена в обратную сторону, машина может служить для извлечения соли из раствора.

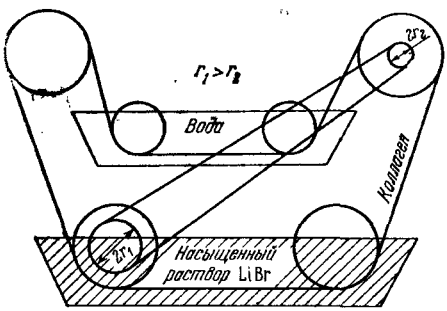


Рис. 12.3. Механохимическая машина Качальского и Оплатки

Полианионное волокно сокращается при понижении pH, скажем, при добавлении HCl. Увеличение n_{HCl} уменьшает l при постоянной силе f, т. е.

$$\left(\frac{\partial l}{\partial n_{\mathrm{HCl}}}\right)_f < 0.$$

Напротив, в изометрических условиях добавление HCl увеличивает силу:

$$\left(\frac{\partial f}{\partial n_{\mathrm{HCl}}}\right)_l > 0.$$

Обратный эффект состоит в изменении pH среды, окружающей полианионное волокно, если его растягивают. Таким образом,

$$-\left(\frac{\partial l}{\partial n_{\mathrm{HCl}}}\right)_f = \left(\frac{\partial \mu}{\partial f}\right)_{n_{\mathrm{HCl}}} > 0.$$

Механохимическая природа биологической сократительной системы была открыта Энгельгардтом и Любимовой (1939), изучавшими *миозин* — белок мышечного волокна (см. с. 394). При добавлении АТФ происходит сокращение миозиновых волокон, имеющее обратимый характер.

Механохимия полиэлектролитов определяется конформационными превращениями макромолекул. Превращения эти кооперативны. Константы диссоциации ионизуемых групп в полимере отличаются от таковых для мономера, вследствие электростатического отталкивания соседних заряженных групп, зависящего от конформаций цепи. Эти явления находят свое выражение в кривых потенциометрического титрования (см. § 3.7).

При не очень малых силах f, достаточных для ориентации полиэлектролитной цепи как целого, длина цепи выражается

уравнением (см. § 3.1)

$$\overline{x} = \frac{f}{3\kappa T}\overline{h_0^2}. \qquad (12.10)$$

Средний квадрат расстояния между концами цепи $\overline{h_0^2}$ зависит от степени ионизации α, т. е. от pH среды. Если $d\overline{h_0^2}/d\alpha > 0$, то полиэлектролитные цепи растягиваются при ионизации под действием постоянной силы и сокращаются при уменьшении степени ионизации. Если знак производной отрицателен, то эффект pH противоположен. Второй случай реализуется у синтетических полипептидов — размеры клубка уменьшаются с ростом α, так как увеличение степени ионизации разрушает спиральную структуру. В общем случае

$$\overline{h_0^2} \approx (\overline{h_0^2})_{\alpha=0} \exp\left(-\frac{\alpha^2 \Delta E}{\kappa T}\right), \qquad (12.11)$$

где ΔE — разность энергий взаимодействия свободных зарядов в свернутой и вытянутой конформациях цепи; ΔE есть мера кооперативности системы: если $\Delta E = 0$, то цепь некооперативна, $\overline{h_0^2}$ не зависит от α. Знак производной $d\overline{h_0^2}/d\alpha$ зависит от знака ΔE. Та же теория позволяет определить, как изменяется pH среды при растяжении цепи.

Описанный кооперативный механизм не единственный — возможны также полиэлектролитные механохимические процессы, определяемые изменениями степени связывания ионов.

Таким образом, изменения конформаций цепи, вызванные изменением химического окружения при воздействии постоянной силы, производят механическую работу. В свою очередь, действующая сила должна менять конформации цепи. Теория показывает, что если приложенная сила не очень велика, то она стабилизует спиральную конформацию цепи. Напротив, большая сила стабилизует конформацию сильно вытянутого клубка. В заряженных цепях не очень большая внешняя сила приводит к увеличению степени диссоциации, вызывающей переход спираль — клубок при фиксированной температуре. При большой силе степень диссоциации, вызывающая переход, может быть меньше, чем в отсутствие силы. В зависимости от величины приложенной силы при переходе спираль — вытянутый клубок может наблюдаться как увеличение, так и уменьшение размеров цепи в направлении силы.

Биологические сократительные системы, выполняющие механохимические процессы, далеки от простых полиэлектролитных моделей. Однако свойства полиэлектролитов существенны для понимания механохимических явлений.

Имеются все основания считать, что в механохимических биологических процессах источником необходимой химической энергии являются макроэргические вещества, прежде всего АТФ.

Гидролиз АТФ происходит с участием АТФ-азы. Рабочими веществами механохимических процессов служат сократительные белки. Открытие АТФ-азной активности одного из них — миозина мышцы, сделанное Энгельгардтом и Любимовой, является ключевым для всей биологической механохимии.

Рассматривая биологические механохимические процессы, мы уделим главное внимание мышечному сокращению.

§ 12.2. Структура мышцы и мышечных белков

Позвоночные животные имеют три вида мышц — гладкие мышцы в стенках полых органов, поперечно-полосатые мышцы сердца и поперечно-полосатые скелетные мышцы. Последующее изложение относится преимущественно к последним.

Мышцы имеют волокнистое строение. Под обычным микроскопом без труда наблюдается поперечно-полосатая структура мышечных волокон. Отдельное мышечное волокно имеет диаметр

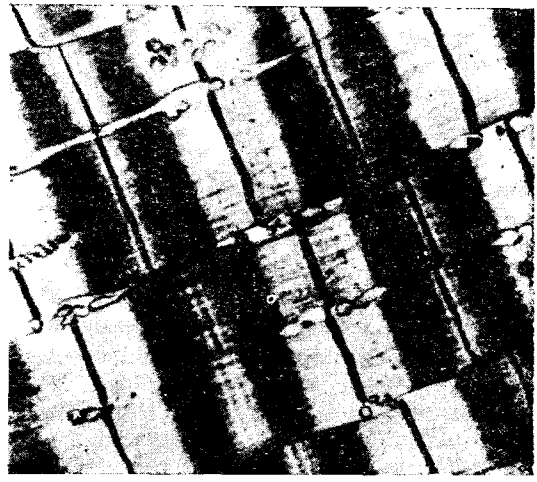


Рис. 12.4. Электронная микрофотография миофибриллы мышцы лягушки

0,02—0,08 мм (20—80 мкм). Оно окружено мембраной, имеющей обычную толщину около 0,01 мкм. Волокно состоит из 1000—2000 более тонких волокон — *миофибрилл* диаметром 1—2 мкм. Фибриллы имеют оболочку, образованную трубочками и пузырьками *саркоплазматического ретикулума*. Микроскопическое строение миофибриллы показано на рис. 12.4. В свою очередь, миофибрилла состоит из ряда белковых нитей — толстых и тонких. Симметрия их расположения в поперечном сечении гексагональная (рис. 12.5). На рис. 12.6 показано продольное сечение миофибриллы, а на рис. 12.7 — ее схематическое строение. Черные линии на рис. 12.6 (они отчетливо видны и на рис. 12.4) — это так

называемые Z-*линии* — продольные сечения Z-дисков. Участок миофибриллы между двумя Z-линиями называется *саркомером*. Он разделяется на несколько зон, хорошо наблюдаемых в поляризационном микроскопе. Центральная полоса А анизотропна, обладает двулучепреломлением. К ней примыкают с двух сторон изотропные I-полосы. При растяжении покоящейся мышцы в середине А-полосы появляется зона Н меньшей плотности. Эти

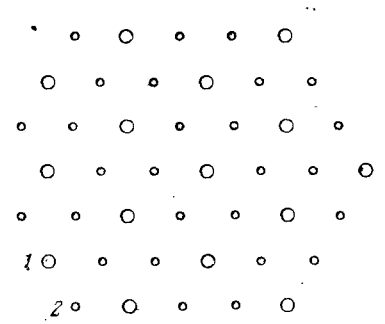


Рис. 12.5. Схема участка поперечного сечения миофибриллы: *1* — толстые нити, *2* — тонкие нити

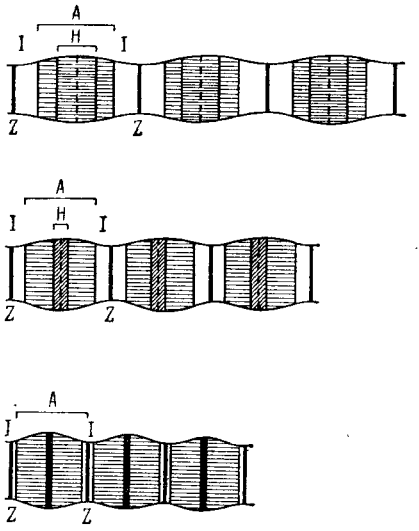


Рис. 12.6. Схема продольного сечения миофибриллы при трех разных ее длинах

детали структуры изображены схематически на рис. 12.6 и 12.7.

Электронно-микроскопические исследования, проведенные Х. Хаксли и Хансон, раскрыли расположение толстых и тонких белковых нитей в саркомере (рис. 12.5 и 12.7). Толстые нити образованы белком миозином, тонкие — *актином*. Каждая толстая нить состоит из 180—360 продольно ориентированных молекул миозина, ответственных за анизотропию плотной А-полосы. Менее плотная I-полоса образована тонкими нитями белка актина, молекулы которого представляют собой двойные спирали (F-*форма актина*), возникшие в результате полимеризации глобулярного G-*актина*. В саркомере число G-глобул равно примерно 800 на одну тонкую нить. Тонкие нити F-актина проходят через Z-диски.

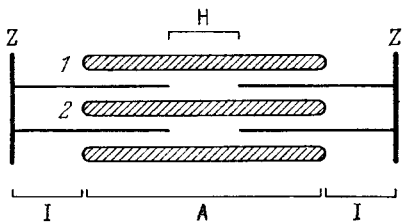


Рис. 12.7. Схема строения саркомера

Актиновая нить представляет собой двойную спираль с G-субъединицами, повторяющимися через 5,46 нм вдоль каждой из двух нитей с расстоянием между точками пересечения 36—37 нм.

Диаметр двойной спирали актина 6—8 нм. Толстые нити миозина имеют диаметр 14 нм. Из миозиновой нити выступают «головки», расположенные на нити по спирали. На данном уровне два выступа находятся напротив друг друга. Следующие два выступа находятся на расстоянии 14,3 нм и повернуты относительно первой пары на 122°. Структура как целое повторяется с периодом $3 \times 14{,}3 = 42{,}9$ нм.

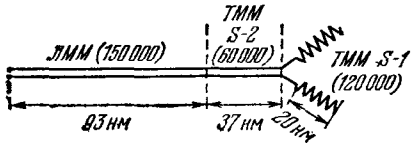


Рис. 12.8. Схема строения молекулы миозина. Указаны продольные размеры фрагментов и их м. м.

Миозин представляет собой фибриллярный белок — он состоит из молекул длиною 150 нм, имеющих диаметр около 2 нм. Утолщенный конец молекулы («головка») имеет длину ≈20 нм и ширину ≈4 нм. Подробное электронно-микроскопическое исследование миозина привело к результатам, показанным на рис. 12.8. Молекула построена из *легкого меромиозина* (*ЛММ*) и *тяжелого меромиозина* (*ТММ*), имеющего два фрагмента S-1 и S-2. Молекулярные массы и размеры этих фрагментов указаны на рис. 12.8. Длинная правая часть молекулы является двойной суперспиралью. Общая м. м. миозина $5 \cdot 10^5$, степень α-спиральности велика (~58%).

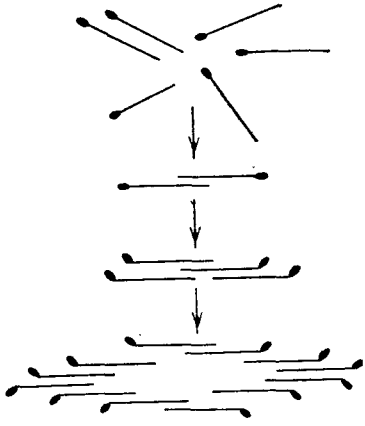


Рис. 12.9. Схема агрегации молекул миозина

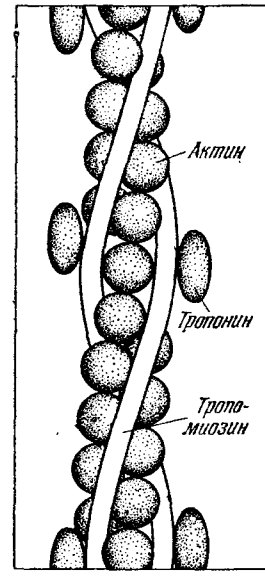


Рис. 12.10. Схема строения тонкой нити

При образовании толстой нити молекулы миозина агрегируют, по-видимому, в результате электростатических взаимодействий

между их «хвостами» (ЛММ). Схема агрегации показана на рис. 12.9. «Головки», выступающие из толстой нити, образованы фрагментами S-1 ТММ.

Сфероидальные мономеры G-актина имеют диаметр ~5,5 нм и молекулярную массу 46 000—47 000. Степень α-спиральности около 30%. Полимеризация G-актина в F-актин происходит с участием АТФ:

$$n(\text{G-актин-АТФ}) \rightleftharpoons (\text{F-актин-}n\text{ АДФ}) + n\,\Phi_н.$$

Полимеризация в растворе идет в присутствии солей, в частности, Mg^{2+}.

В тонких нитях наряду с актином содержатся другие белки — *тропомиозин* и *тропонин*. Тропомиозин имеет м.м. около 70 000,

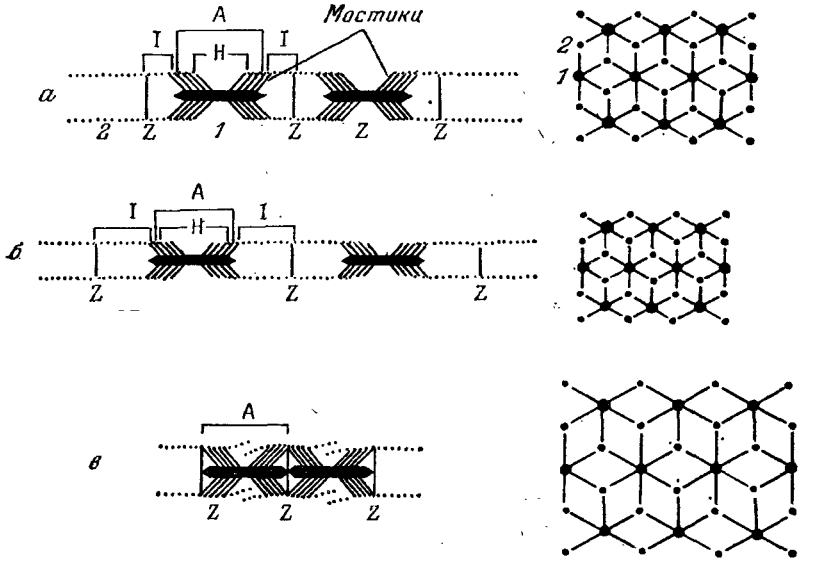


Рис. 12.11. Скользящая модель: *а* — нормальное строение волокна, *б* — растянутое волокно, *в* — сильно укороченное волокно. Справа — поперечные сечения

он состоит из молекул длиной около 45 нм с отношением длинной и короткой осей эффективного эллипсоида более 20. Степень α-спиральности тропомиозина около 90%. Тропонин — глобулярный белок, состоящий из трех компонент с м.м. 37 000, 23 000 и 19 000 (сумма 79 000). Молекулы тропомиозина располагаются вдоль каждой борозды двойной спирали актина, глобула тропонина помещается вблизи конца каждой молекулы тропомиозина. Одна молекула тропомиозина контактирует с семью молекулами G-актина (рис. 12.10).

Пока еще мало известно о других регуляторных белках миофибрилл — об α- и β-актинине и М-белке.

Вазина и соавторы установили, что различные сократительные белки образуют в растворе анизотропные жидкокристаллические структуры, способные к полиморфным превращениям. Как мы видели (с. 337), эти свойства определяют функциональность биологических мембран. Можно думать, что жидкокристаллические свойства сократительных белков существенны для мышечного сокращения.

Световая и электронная микроскопия позволили установить основные структурные особенности мышечного сокращения.

При сокращении (укорочении) мышцы происходит сужение I-полос без изменения протяженности A-полосы; Z-диски движутся навстречу друг другу. В конечном счете I-полосы исчезают вовсе, а в центре саркомера появляется уплотнение. Объем саркомера при укорочении меняется мало, следовательно, саркомер становится толще. Это показано схематически на рис. 12.6.

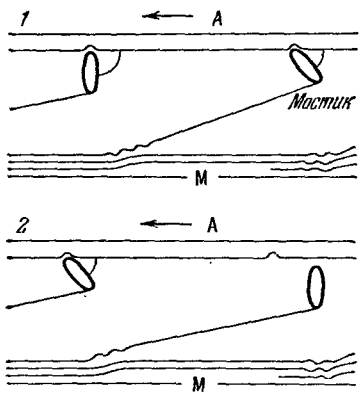


Рис. 12.12. Изменение угла между мостиками и тонкой нитью: *1* и *2* — последовательные моменты движения; А — актин, М — миозин

Электронная микроскопия показывает, что при укорочении толстые нити вдвигаются между тонкими и саркомер укорачивается подобно подзорной трубе. Это *скользящая модель мышцы*, установленная Х. Хаксли.

Взаимодействие толстых и тонких нитей происходит посредством ТММ «головок» миозина, образующих «*мостики*», соединяющие нити. В нормальном физиологическом состоянии мышцы перекрывание между толстыми и тонкими нитями таково, что могут образоваться все возможные мостики (рис. 12.11, *а*); при сильном растяжении этого уже нет (рис. 12.11, *б*). При больших укорочениях, по-видимому, происходит деформация тонких нитей (рис. 12.11, *в*).

Миозин ответствен за анизотропию A-полосы: в I-полосах миозина нет, и, следовательно, тонкие нити сами по себе анизотропии не создают.

В скользящей модели каждый мостик работает циклически. Мостик толкает или тянет актин к центру A-полосы на расстояние порядка 5—10 нм, затем он отщепляется от актина и присоединяется к актину вновь в другой его точке, находившейся вначале на большем удалении от центра A-полосы. Далее цикл повторяется. Непрерывное движение актиновых нитей происходит в результате асинхронного действия мостиков.

Толкающее или тянущее усилие, развиваемое мостиком, может быть лишь результатом конформационного превращения. Такое

превращение может выражаться либо в активном изменении угла, под которым «головка» ТММ присоединена к тонкой нити, либо в изменении ее формы. Опыт показывает, что связь мостиков с толстыми нитями гибкая, а их связь с тонкими нитями является весьма жесткой. На рис. 12.12 показана модель перемещения тонкой нити в результате изменения угла, под которым к ней присоединен мостик.

При окоченении мышцы (rigor) возникают жесткие и неподвижные связи мостиков с тонкими нитями. Спиральная периодичность нарушается, исчезает период 42,9 нм и заменяется слоевыми линиями при 36—38 нм. В то же время период 14,3 нм сохраняется. Эти явления также можно объяснить изменением в расположении мостиков при сохранении основного скелета толстой нити.

Описанная структурная картина, согласующаяся со скользящей моделью, надежно установлена. Физическая теория мышечного сокращения должна основываться на этой модели, как на опытном факте. Молекулярное истолкование мышечного сокращения должно наряду со структурными данными учитывать результаты биохимических и физических исследований.

§ 12.3. Химия и физика мышцы

Основой биохимии мышцы является уже упомянутая (с. 392) ферментативная активность миозина (М) — его способность катализировать гидролитическое расщепление АТФ. Схема реакции:

$$М + АТФ \rightleftarrows М - АТФ \rightleftarrows М\begin{matrix}АДФ\\ \diagup\\ \diagdown\\ Ф\end{matrix} \rightleftarrows М + АДФ + Ф_н.$$

Реакция сильно зависит от ионной среды, от присутствия двухвалентных катионов. В мышце она реализуется при pH 7,4. Для реакции *in vitro* необходимо присутствие ионов Ca^{2+}, она оптимальна при концентрации этих ионов, равной концентрации АТФ или несколько большей. Ионы Mg^{2+} ингибируют АТФ-азную активность миозина *in vitro*.

В мышце миозин функционирует при взаимодействии с актином,— как уже сказано, через мостики ТММ — в актомиозиновом комплексе. В этих условиях ионы Mg^{2+} оказывают активирующее действие. Таким образом, для АТФ-азной активности *in vivo* необходимы и Ca^{2+}, и Mg^{2+}.

Активация поперечно-полосатой мышцы происходит в результате передачи на нее нервного импульса. Сокращение может быть инициировано и искусственным электрическим импульсом (опыты Гальвани). Действие импульса приводит к увеличению концентрации ионов Ca^{2+}, взаимодействующих с фибриллой. Каждая фибрилла окружена сложной системой продольных и поперечных тонких сосудов — *саркоплазматическим ретикулумом.* С помощью

меченых атомов ^{45}Ca доказано, что подача импульса вызывает выход ионов Ca^{2+} из ретикулума в жидкость, омывающую белковые нити,— в *саркоплазму*. Концентрация свободных ионов Ca^{2+} в релаксировавшей мышце очень мала, вероятно, меньше 10^{-7}—10^{-8} М. При активации она повышается на 2—3 порядка.

Наряду с реакцией, указанной на с. 397, идет *реакция Ломанна*

$$\text{АДФ} + \text{Фосфокреатин} \xrightleftharpoons{\text{Креатинкиназа}} \text{АТФ} + \text{Креатин}.$$

Доказано, что АТФ расщепляется именно при сокращении мышцы. Фтординитробензол ингибирует креатинкиназу и прекращает реакцию Ломанна. В то же время он не влияет на сокращение мышцы и на первую реакцию. С помощью этого реагента установлено, что АТФ расщепляется как при одиночном сокращении мышцы (twitch), так и при тетаническом (столбнячном) сокращении. С другой стороны, можно заблокировать йодацетатом обратную реакцию образования фосфокреатина из креатина. Тогда расход фосфокреатина характеризует количество АДФ, образующееся при сокращении. Количества расщепляемого при сокращении мышцы АТФ соответствуют убыли фосфокреатина в реакции Ломанна.

Релаксация мышцы к исходному состоянию определяется уходом ионов Ca^{2+} в ретикулум из саркоплазмы.

Таким образом, ионы Ca^{2+} регулируют сократительные процессы в мышцах. По-видимому, это происходит при непосредственном участии тропонина и тропомиозина (см. с. 395). В отсутствие Ca^{2+} тропинин в комплексе с тропомиозином ингибирует взаимодействие актина с миозиновыми мостиками. Кальций, поступивший в саркоплазму, связывается с тропонином и прекращает его ингибирующее действие. Следовательно, Ca^{2+} играет роль дерепрессора и переключает тонкую нить из неактивного в активное состояние.

Обратимся теперь к механическим свойствам мышцы, изученным в серии многолетних биофизических работ Хилла, а также других авторов.

Термин «сокращение» употребляется применительно к мышце в двух смыслах. *Изометрическое сокращение* происходит в мышце при ее фиксированной длине. При этом развивается напряжение без укорочения. Наоборот, *изотоническое сокращение* означает укорочение мышцы при постоянной нагрузке. В этом случае мышца производит работу, поднимая груз.

Экспериментальная методика соответствующих измерений была развита в классических работах Хилла и в дальнейшем не раз совершенствовалась. На рис. 12.13 изображена схема установки. Мышца *М* прикреплена к рычагу. Другой конец мышцы закреплен. Сокращение стимулируется электродами *Э*. При изучении одиночных изотонических сокращений мышца нагружается в положении *Р*. Напряжение определяется с помощью датчика, находящегося в положении *А*. При измерении изометриче-

ского напряжения датчик переводится в положение *Б*. Изотоническое укорочение определяется по движению другого конца рычага, фиксируемому с помощью фотоэлемента *Ф*. Стопор *С*, контролируемый электромагнитом *ЭМ*, применяется для того, чтобы поддерживать желаемую длину мышцы или освобождать изотермически сокращаемую мышцу до желаемой степени. Опыты с икроножной мышцей лягушки показывают, что в первые

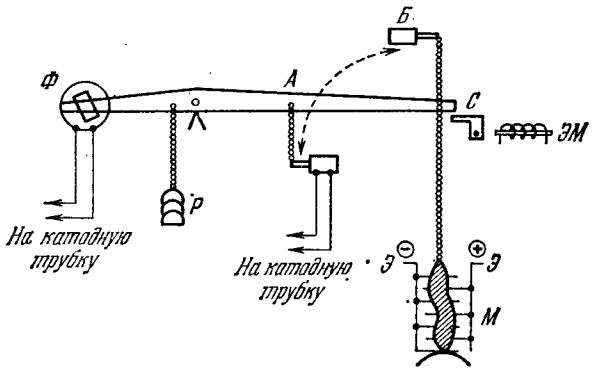


Рис. 12.13. Схема установки для изучения сокращения мышцы (Хилл). Объяснение в тексте

15 мс после возбуждения одиночного изометрического сокращения происходит ряд изменений, определяемых процессом выделения ионов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума. Затем напряжение начинает расти, достигая своего максимума через 170 мс (при 0 °С). Далее оно падает, исчезая полностью более чем через 1 с. При изотоническом сокращении укорочение убывает с ростом груза P; его максимум достигается тем раньше, чем больше этот груз. Затем происходит релаксация к исходному состоянию. Развитие изотонического напряжения в мышце следует практически той же временно́й кривой, что и развитие изометрического напряжения.

Хилл эмпирически установил основное, характеристическое уравнение в механике мышечного сокращения. Оно связывает стационарную скорость изотонического сокращения, укорочения, V с нагрузкой P и имеет гиперболическую форму:

$$(P + a)V = b(P_0 + P), \qquad (12.12)$$

P_0 — максимальное напряжение, развиваемое мышцей, или максимальный груз, поддерживаемый мышцей без ее удлинения, a и b — константы. При $P = 0$ скорость укорочения максимальна:

$$V_{max} = b\frac{P_0}{a}. \qquad (12.13)$$

Напротив, при $P = P_0$ имеем $V = 0$. При $P > P_0$ мышца уже не

укорачивается, но удлиняется. Это удлинение не следует уравнению (12.12).

Константа b, имеющая размерность скорости, быстро возрастает с температурой: при нагревании на 10 °С вблизи 0 °С b удваивается. Константа a составляет от $0{,}25P_0$ до $0{,}4P_0$. Следовательно, V_{max} больше b в 2,5—4 раза.

Уравнение Хилла справедливо лишь в условиях укорочения, идущего с постоянной скоростью. В то же время область его

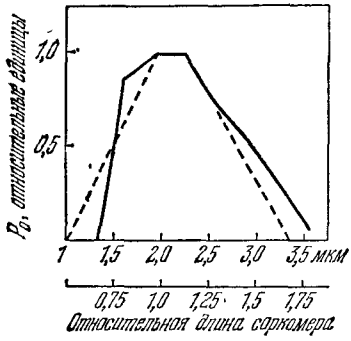


Рис. 12.14. Зависимость максимальной силы от длины саркомера. Сплошная линия — данные Эдмана, штриховая — Шенберга и Подольского

применения ограничивается длинами мышцы, близкими к физиологическим. Максимальное напряжение P_0 зависит от длины саркомера. На рис. 12.14 приведена зависимость P_0 от относительной длины саркомера в мышечном волокне: P_0 максимально и отвечает некоторому плато на рис. 12.14 при длинах, близких к физиологической. Этому соответствует полное перекрывание нитей актина и ТММ-«головок» миозиновых нитей и, следовательно, возможность образования максимального числа мостиков (см. рис. 12.11, *а*). При больших длинах саркомеров перекрывание и число возможных мостиков убывает (рис. 12.11, *б*), убывает и P_0. Наконец, при больших укорочениях нити деформируются (рис. 12.11, *в*) и P_0 снова падает. Уравнение Хилла справедливо в области плато, в области наибольших P_0, т. е. при длинах саркомера примерно от 1,7 до 2,5 мкм или при относительных длинах от 0,9 до 1,25. Величина P_0 мало зависит от температуры, слегка увеличиваясь с ее ростом. Это относится и к константе a, пропорциональной P_0.

Механические свойства мышцы изучаются при сокращениях, одиночных или тетаническом. Единичный импульс вызывает одиночное сокращение. При достаточно частых импульсах, подаваемых подряд, скажем, при 15 импульсах в 1 с, одиночные сокращения объединяются в тетаническое сокращение, так как каждый следующий импульс попадает в рефрактерный период предыдущего (см. с. 363). Работа, производимая мышцей при сокращении, равна, согласно уравнению Хилла,

$$W = PVt = bPt\frac{P_0 - P}{P + a}. \qquad (12.14)$$

Функция $W(P)$ имеет колоколообразную форму; W обращается в нуль при $P=P_0$ и $P=0$, достигает максимума при $P=[a(P_0+a)]^{1/2}-a$ и, так как $a\approx 25\,P_0$, при $P\approx 0{,}31\,P_0$.

Согласно скользящей модели, напряжение, развиваемое мышцей, целиком определяется нитями актина и миозина и Z-дисками. Все эти элементы не вполне жестки, они обладают определенной податливостью. Конечные саркомеры мышечного волокна связаны с соединительной тканью сухожилий, и здесь также имеется податливость, пластичность. Одновременно эти элементы вносят некоторую упругость в движение мышцы. Однако общий вклад упругих и пластических деформаций не превышает 3% развиваемого мышцей напряжения. Все же следует рассматривать мышцу как вязкоупругое тело. Как мы увидим, уравнение Хилла описывает только вязкое течение в мышце.

Исследование вязкоупругих свойств мышцы существенно при выяснении ее кинетического поведения в нестационарном режиме (см. § 12.5).

Максимальное напряжение P_0 икроножной мышцы лягушки равно приблизительно 30 Н/см^2, что соответствует $3\cdot 10^{-10}$ Н на тонкую нить. Считая, что каждый единичный элемент содержит одну молекулу миозина и каждый цикл замыкания и размыкания мостика сопровождается расщеплением одной молекулы АТФ, энергия которой используется на 50%, получаем следующие характеристики единичного элемента: сила $3\cdot 10^{-12}$ Н, расстояние 10^{-6} см, энергия $6\cdot 10^{-20}$ Дж ($15\,kT$), время 1 мс.

Одновременно с производимой работой укорачивающаяся мышца выделяет тепло. Тепло выделяется и при изометрическом сокращении. При релаксации изотонического напряжения опускающийся груз производит над мышцей работу, также превращающуюся в тепло.

На ранней стадии сокращения, до развития напряжения или до укорочения выделяется теплота активации Q_a порядка 4,2 мДж на 1 г массы мышцы. Эта теплота, по-видимому, связана с выделением ионов Ca^{2+} в саркоплазму и с их взаимодействием с актомиозиновой системой. Далее, по мере сокращения мышцы и производства работы, выделяется теплота сокращения Q_c. Если мышца укорачивается, Q_c выделяется быстрее, чем при изометрическом сокращении за то же время. Общее изменение энергии в процессе сокращения равно

$$\Delta E = Q_a + Q_c + W. \qquad (12.15)$$

Скорость выделения теплоты максимальна в области физиологических размеров мышцы. По-видимому, Q_c связано с поддержанием напряжения и возникает в результате взаимодействия толстых и тонких нитей.

В опытах Хилла мышца непрерывно возбуждалась в изометрических условиях, а затем сразу отпускалась и укорачивалась, поднимая груз. При этом выделяется сверх изометрической экстратеплота — теплота укорочения. Экстратеплота пропорциональ-

на укорочению при постоянной нагрузке, а при постоянном укорочении — нагрузке. В стационарных изотонических условиях мощность мышцы, т. е. скорость выделения энергии в виде теплоты и работы, равна

$$\dot{E} = W + \alpha V + m = (\alpha + P)V + m, \qquad (12.16)$$

где m — скорость выделения теплоты при изометрическом тетаническом сокращении, αV — скорость выделения экстратеплоты.

Установлено, что если мышца может укорачиваться, полная энергия, выделяемая мышцей во время одиночного сокращения, больше, чем при изометрическом сокращении. Это *эффект Фенна.*

Механическая эффективность мышцы может быть определена как отношение получаемой работы к израсходованной энергии

$$\eta' = W/E = W/(W + Q). \qquad (12.17)$$

В фазе сокращения η' достигает 45% у лягушки и 75% — у черепахи. В идеальном циклическом механохимическом процессе, производящем работу, свободная энергия остается постоянной:

$$\oint \Delta G = 0,$$

или согласно (12.3)

$$\oint f\,dl = -\oint \mu\,dn \qquad (12.18)$$

(ср. (12.5)). Значение η' характеризует отклонение от (12.18), т. е. деградацию химической энергии в теплоту.

§ 12.4. Теория мышечного сокращения

Молекулярная теория мышечного сокращения до сих пор не построена. Однако ряд фактов получил удовлетворительное истолкование.

Оплатка развил теорию стационарного мышечного сокращения в рамках неравновесной термодинамики (1972). Сокращение рассматривается как пластическое течение с трением. Уравнение Хилла (12.12) используется как опытный факт и устанавливается связь скорости укорочения V со скоростью расщепления АТФ.

В ряде работ рассматриваются электростатические эффекты, применяется полиэлектролитная модель мышечных белков. Трудно совместить возможные электростатические эффекты в среде, представляющей собой децинормальный солевой раствор, с наблюдаемыми большими значениями P_0.

Сцент-Дьердьи в свое время предложил гипотезу сокращения, основанную на квантовой миграции энергии по квазикристаллической сетке воды, окружающей миозин. Эти идеи полностью спекулятивны. Много позднее Мак-Клэйр вновь обратился к рассмотрению резонансного переноса «молекулярной энергии» в

мышце (1972). Давыдов предположил, что перенос энергии происходит путем распространения *солитона* — одиночной, недиссипирующей волны колебательного возбуждения C=O-связей в α-спиралях миозина. В результате толстая нить изгибается, обеспечивая замыкание мостиков (1973). Эти гипотезы не имеют экспериментальных подтверждений и теоретических оснований.

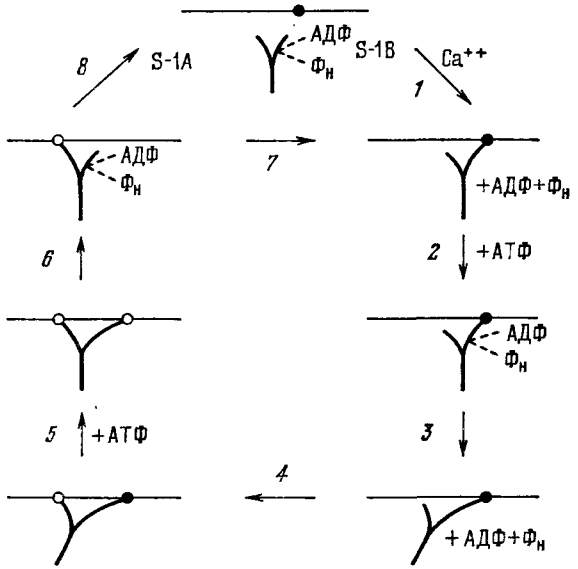


Рис. 12.15. Схема работы мостика: S-1B — часть «головки» миозина, содержащая активный центр АТФ-азы и центр связывания с F-актином, S-1A содержит только центр связывания с F-актином; *1* — поступление Ca^{2+}, связывание S-1B; *2* — фосфорилирование; *3* — дефосфорилирование, конформационный переход, скольжение; *4* — связывание S-1A; *5* — образование комплекса миозина с АДФ и $Ф_н$; *6* — диссоциация связи S-1B, спонтанный конформационный переход; *7* — обмен связи S-1A → S-1B; *8* — разрыв мостика

Распространение возбуждения в мышце (а также в нерве) происходит с небольшой скоростью. Здесь нет проблемы, которая требовала бы для своего решения механизма типа солитонного. Выше уже говорилось об автоволновом, а не солитонном распространении нервного импульса.

Тономура предложил наглядную молекулярную интерпретацию скользящей модели (см. с. 396). Схема Тономуры приведена на рис. 12.15. Предполагается, что: 1) сокращение связано с фосфорилированием и дефосфорилированием миозина; 2) конформация «головки» миозина меняется при добавлении АТФ; 3) связь F-актин-миозин расщепляется с образованием комплекса миозин-АТФ при высоких и миозин-фосфат-АДФ при низких концентрациях АТФ; прочность связи зависит от конформаций миозина и комплекса F-актина с регуляторным белком, конфор-

мация которого контролируется Ca^{2+}; 4) полный цикл происходит вследствие расщепления связи миозин-F-актин после конформационного превращения «головки» миозина, вызванного выделением энергии. Связь восстанавливается, когда молекула миозина возвращается в исходную форму.

Конформационные изменения в миозине и актине при действии АТФ и в сокращающейся мышце установлены многими методами. Однако они изучены еще недостаточно для обоснования модели, подобной описанной.

На с. 396 уже говорилось о жидкокристаллических свойствах сократительных белков. При укорочении мышцы меняется период решетки, построенной из протофибрилл. При вдвижении решетки тонких нитей в решетку толстых нитей тетрагональная симметрия заменяется гексагональной. Это можно трактовать как полиморфный переход в жидкокристаллической системе. Вопрос требует дальнейших исследований.

Первая попытка построить количественную физическую теорию, основанную на скользящей модели, принадлежит А. Хаксли (1957). Предполагается, что активный выступ ТММ (обозначаемый далее М) осциллирует вдоль тонкой нити, а активный центр актина (А) неподвижен. Реакции имеют вид

$$\text{А} + \text{М} \rightarrow \text{АМ} \quad \text{(образование мостика)},$$

$$\text{АМ} + \text{АТФ} \rightarrow \text{А} \cdot \text{АТФ} + \text{М} \quad \text{(разрыв мостика)},$$

$$\text{А} \cdot \text{АТФ} \rightarrow \text{А} \cdot \text{АДФ} + \Phi_н \quad \text{(расщепление АТФ)}.$$

Решается кинетическая задача, причем константам скоростей двух первых реакций приписываются определенные зависимости от расстояния между А и М вдоль миофибриллы. Решение учитывает относительное перемещение А и М при укорочении саркомера. При численном подборе ряда параметров получается согласие с результатами вычисления $P(V)$ по уравнению Хилла.

Теория Хаксли усовершенствована Дещеревским (1968). Рассматриваются три состояния мостиков: замкнутые мостики, развивающие тянущую силу; замкнутые мостики, тормозящие скольжение нитей, и разомкнутые мостики. Мостики замыкаются независимо друг от друга и тянут нити, вызывая активное сокращение. Далее те же мостики тормозят движение, так как нити переместились, и, наконец, мостики разрываются. Обозначив через n_0 полное число активных ТММ-выступов в половине толстой нити, через n — число тянущих и m — число тормозящих мостиков, получаем

$$\dot{n} = k_1 (n_0 - n - m) - \frac{v}{L} n, \tag{12.19}$$

$$\dot{m} = \frac{v}{L} n - k_2 m. \tag{12.20}$$

Здесь v/L — константа скорости превращения тянущих мостиков в тормозящие, равная скорости относительного перемещения

нитей v, деленной на расстояние L между двумя соседними активными центрами актина, на которых может быть замкнут мостик. К этим уравнениям добавляется выражение второго закона Ньютона:

$$M\dot{v} = f_0(n - m) - fn_0, \tag{12.21}$$

где M — перемещаемая масса, f_0 — активная сила, развиваемая одним тянущим мостиком, f — внешняя сила (нагрузка), приходящаяся на один мостик. Уравнение (12.21) описывает движение с трением, выраженным как $f_0 m$. В стационарных условиях $\dot{n} = \dot{m} = 0$ и $\dot{v} = 0$. Исключая при этом из (12.19)—(12.21) n, m и n_0, находим

$$(f + a)v = b(f_0 - f). \tag{12.22}$$

Это уравнение совпадает с уравнением Хилла (12.12). Все величины в (12.22) отнесены к одному мостику, v — скорость укорочения в половине саркомера. Константы a и b выражаются через k_1, k_2, f_0 и L:

$$a = k_1 f_0/(k_1 + k_2), \tag{12.23}$$

$$b = k_1 k_2 L/(k_1 + k_2). \tag{12.24}$$

Таким образом, эмпирическое уравнение Хилла выведено теоретически. Уравнение отвечает стационарному скольжению нитей с силой трения, пропорциональной скорости.

Мы видим, что цикл Дещеревского не включает обратных процессов. При их учете получаем (ср. с. 315)

$$k_1 k_2 \frac{v}{L} = k_{-1} k_{-2} k_{-3},$$

и, если k_{-1}, $k_{-2} \ll k_1$, k_2, то $k_{-3} \gg v/L$. Должен быть, следовательно, второй цикл, приводящий в движение рассмотренный. Этот второй цикл — замкнутая цепь химических превращений, в ходе которых расщепляется АТФ.

Эта теория дает правильное решение для стационарного изотонического сокращения, но не объясняет развитие напряжения при изометрическом сокращении.

Изложим теорию стационарного сокращения, основанную на теории абсолютных скоростей реакций (Волькенштейн, 1969).

Исходим из скользящей модели с трением. Тянущее или толкающее усилие возникает в результате замыкания мостика и следующих за этим событий, состоящих в превращении химической энергии АТФ в энергию конформационной перестройки белковой сократительной системы. Каждый мостик при замыкании развивает напряжение f_0. Замыкание и размыкание мостика и создает трение между нитями. Второй закон Ньютона запишется в виде

$$M\dot{V} = P' - P - BV, \tag{12.25}$$

где M — перемещаемая масса, P — приложенное напряжение, P' — развиваемое напряжение, BV — сила трения. В стационар-

ных условиях $\dot{V}=0$. Представим P в виде $n_0 f$, где n_0 — максимальное число работающих мостиков. Мостики работают асинхронно, и при данной нагрузке в укорочении мышцы участвует лишь некоторое эффективное число мостиков $n=wn_0$, где $w<1$. Эти мостики, замыкаясь, развивают напряжение $P'=nf_0=wn_0f_0$. Тем самым они ответственны за внутреннее трение, следовательно, $B=\beta n=\beta w n_0$. Величина w зависит от P, т. е. от f. Получаем для стационарного режима

$$wf_0-f-\beta wv=0, \tag{12.26}$$

откуда

$$v=\frac{1}{\beta}\left(f_0-\frac{f}{w(f)}\right). \tag{12.27}$$

Физическое предположение состоит в том, что $w=n/n_0$ является функцией лишь силы f, но не скорости v. Зависимость w от v возникает лишь вследствие зависимости силы от скорости. Это предположение независимо от закона сил (12.25), (12.26). Определим вид функции $w(f)$. При максимальной нагрузке P_0 груз поддерживают все мостики, т. е. $n(f_0)=n_0w(f_0)=n_0$ и $w(f_0)=1$. Соответственно, согласно уравнению (12.27), при $f=f_0$ скорость $v=0$. При $f=0$ работает минимальное число мостиков $n(0)=n_0w(0)=n_{\min}$ и $w(0)=n_{\min}/n_0\equiv r<1$. Максимальная скорость укорочения при $f=0$ равна

$$v_{\max}=f_0/\beta. \tag{12.28}$$

Сделаем естественное предположение о том, что напряжение, развиваемое мышцей при изометрическом сокращении, или груз, поддерживаемый мышцей при изотоническом сокращении, линейно зависят от числа работающих мостиков, поскольку каждый из них развивает постоянное напряжение f_0. Следовательно,

$$P=n_0f=(A+Cn)f_0.$$

При $f=f_0$ имеем $n=n_0$ и $n_0=A+Cn_0$; при $f=0$ получаем $n=n_{\min}=rn_0$ и $A=-Crn_0$. Находим

$$w=n/n_0=r+(1-r)f/f_0. \tag{12.29}$$

Подставляя это выражение в (12.27), получаем уравнение Хилла в форме

$$v\left(\frac{r}{1-r}f_0+f\right)=\frac{f_0}{\beta}\frac{r}{1-r}(f_0-f). \tag{12.30}$$

Таким образом, константы a и b имеют вид

$$a=\frac{r}{1-r}f_0, \tag{12.31}$$

$$b=\frac{r}{1-r}\frac{f_0}{\beta}=\frac{a}{\beta}. \tag{12.32}$$

Опыт дает $a\approx 0{,}25\,f_0$. Следовательно, $r/(1-r)\approx 0{,}25$ и $r\approx 0{,}2$.

Из уравнения (12.30) следует

$$v_{\max} = \frac{f_0}{\beta} = \frac{1-r}{r} b \approx 4b. \qquad (12.33)$$

Трение определяется всей совокупностью событий, происходящих при замыкании мостика. Будем рассматривать как элементарный акт замыкание мостика, гидролиз одной молекулы АТФ, конформационное превращение мостика и производство работы $f_0 L$, где L — путь единичного укорочения, и размыкание мостика. Обратный микроскопический акт приводит к синтезу одной

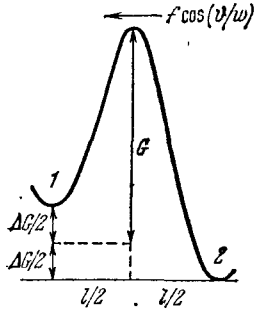


Рис. 12.16. Кривая свободной энергии

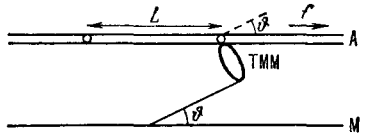


Рис. 12.17. Схема работающего мостика

молекулы АТФ из АДФ и $\Phi_н$ к производству работы $f_0 L$ над системой.

Воспользуемся теорией внутреннего трения жидкостей, развитой Эйрингом (ср. с. 175). Изменение состояния системы можно представить кривой свободной энергии, показанной на рис. 12.16. Здесь *1* — состояние системы до замыкания мостика, *2* — после замыкания и всех последующих событий. Вся совокупность событий, объединенных в рассматриваемый элементарный акт, требует энергии активации. Это видно и непосредственно из сильной зависимости b от температуры (с. 490). Приходящаяся на мостик внешняя сила, равная $P/n = n_0 f/n = f/w$, препятствует переходу $1 \to 2$ и способствует обратному переходу $2 \to 1$. Эта сила направлена вдоль мышечного волокна и, следовательно, под некоторым углом ϑ к мостику (рис. 12.17). Тем самым на мостик действует сила $f \cos\vartheta/w$, которой отвечает энергия $fl \cos\vartheta/w$, где l — длина химической или хелатной связи, соединяющей выступ ТММ с активным центром актина.

Скорость укорочения представится в виде

$$v = (\nu_+ - \nu_-) L \equiv \nu L, \qquad (12.34)$$

где ν_+ и ν_- — числа элементарных актов перехода через активационный барьер в единицу времени соответственно в направлениях $1 \to 2$ и $2 \to 1$. Согласно теории Эйринга имеем (см. рис. 12.16)

$$\nu_+ = \frac{\kappa T}{h} \exp\left(-\frac{G_+}{\kappa T}\right), \quad \nu_- = \frac{\kappa T}{h} \exp\left(-\frac{G_-}{\kappa T}\right), \qquad (12.35)$$

где h — постоянная Планка, κ — постоянная Больцмана,

$$G_+ = G + \frac{fl\cos\vartheta}{2w} - \frac{\Delta G}{2},$$
$$G_- = G - \frac{fl\cos\vartheta}{2w} + \frac{\Delta G}{2}, \tag{12.36}$$

т. е.

$$\nu = \nu_+ - \nu_- = \frac{\kappa T}{h} 2\,\mathrm{sh}\left(\frac{\Delta G}{2\kappa T} - \frac{fl\cos\vartheta}{2w\kappa T}\right)\exp\left(-\frac{G}{\kappa T}\right). \tag{12.37}$$

При $f = f_0$ скорость $v = 0$, т. е. $\nu_+ = \nu_-$. При этом $w = 1$. Получаем $\Delta G = f_0 l\cos\vartheta$ и

$$\nu = \frac{\kappa T}{h} 2\,\mathrm{sh}\left[\frac{l\cos\vartheta}{2\kappa T}\left(f_0 - \frac{f}{w}\right)\right]\exp\left(-\frac{G}{\kappa T}\right). \tag{12.38}$$

Если

$$\left(f_0 - \frac{f}{w}\right) l\cos\vartheta \ll 2\kappa T, \tag{12.39}$$

то

$$\nu \approx \frac{l\cos\vartheta}{h}\left(f_0 - \frac{f}{w}\right)\exp\left(-\frac{G}{\kappa T}\right) \tag{12.40}$$

и

$$v \approx \frac{lL\cos\vartheta}{h}\left(f_0 - \frac{f}{w}\right)\exp\left(-\frac{G}{\kappa T}\right). \tag{12.41}$$

Мы получили уравнение, аналогичное (12.27). Сравнивая уравнения (12.27) и (12.41), находим

$$\beta = \frac{h}{Ll\cos\vartheta}\exp\left(\frac{G}{\kappa T}\right) \tag{12.42}$$

и

$$b = \frac{r}{1-r}\frac{f_0 Ll\cos\vartheta}{h}\exp\left(-\frac{G}{\kappa T}\right), \tag{12.43}$$

$$v_{\max} = \frac{f_0 Ll\cos\vartheta}{h}\exp\left(-\frac{G}{\kappa T}\right). \tag{12.44}$$

Таким образом, β, b, $v_{\max}$ выражены через молекулярные параметры f_0, L, l, $\cos\vartheta$, G.

Проведем численные оценки. Прежде всего необходимо убедиться в справедливости условия (12.39). Напряжение поддерживается в каждой половине саркомера. Для икроножной мышцы лягушки число мостиков N в объеме, равном 1 см^2, умноженному на длину половины саркомера 1,1 мкм, равно $6{,}5\cdot10^{12}$. Опыт дает P_0 порядка 300 кПа. Один мостик создает силу $f_0 = P_0/N = 4{,}6\cdot10^{-12}$ Н. Примем длину связи $l = 0{,}2$ нм и $\cos\vartheta < 1$ положим равным 0,5. Получаем $f_0 l\cos\vartheta = 4{,}6\cdot10^{-22}$ Дж $= 2\kappa T\cdot0{,}055$. Условие выполнено.

Максимальная скорость укорочения икроножной мышцы лягушки при 0 °С $V_{\max}$ равна $1{,}33\Lambda_0/c$, где Λ_0 — начальная длина мышцы. В наших расчетах следует взять $\Lambda_0 = 1{,}1$ мкм — половину длины саркомера. Следовательно, $v_{\max} = 1{,}5$ мкм/с и $b = 0{,}4\cdot10^{-5}$ см/с. Элементарный шаг L имеет значение порядка 10 нм. Подставляя в (12.44) значения f_0, L, $\cos\vartheta$, l из экспериментального значения $v_{\max}$ (или b), находим $G \approx 59$ кДж/моль. При повышении температуры на 10 К (с 300 до 310 К) b должно возрастать в 2,14 раза. Опыт дает увеличение в 2,05 раза. Излагаемая теория хорошо объясняет зависимость константы b от температуры.

Из написанных уравнений следует, что

$$w = b/(b+v). \tag{12.45}$$

Если $v=0$, то $w=1$; если $v=v_{\max}=b(1-r)/r$, то $w=w_{\min}=r$:

$$w_{\min}=r=b/(b+v_{\max}). \tag{12.46}$$

Естественно, что эта теория дает результаты, эквивалентные теории Дещеревского. Из уравнений (12.23) и (12.31) следует: $k_2/k_1=(1-2r)/r$. Подставляя в уравнение (12.19) стационарное значение $m=nv/Lk_2$ из (12.20), находим

$$\dot{n}=k_1n_0-\left(k_1+\frac{k_1+k_2}{k_2L}v\right)n \tag{12.47}$$

и при $\dot{n}=0$ получаем стационарное отношение $n/n_0=w$. Приравнивая его выражению (12.45), получаем

$$k_1\left(k_1+\frac{k_1+k_2}{k_2L}v\right)^{-1}=\frac{b}{b+v}. \tag{12.48}$$

Из этих соотношений находим

$$k_1=\frac{l\cos\vartheta}{h}\frac{f_0r}{1-2r}\exp\left(-\frac{G}{\kappa T}\right),\quad k_2=\frac{l\cos\vartheta}{h}f_0\exp\left(-\frac{G}{\kappa T}\right). \tag{12.49}$$

В изложенной теории трение возникает в результате замыкания и размыкания мостиков, так как эти процессы требуют энергии активации. Теория согласуется с принципом микроскопической обратимости и выражает кинетические константы через молекулярные параметры. Тем не менее это не истинно молекулярная теория — детальный молекулярный механизм сокращения пока не известен. Из теории следует пропорциональность величин b и P_0, фигурирующих в уравнении Хилла.

Теория теплопродукции мышцы предложена Тавадой, Коуносу и Оосавой (1974). Предполагается, что энергия, освобождаемая при сокращении мышцы, слагается из запасенной энергии, диссипируемой в центрах одного типа, и энергии, получаемой за счет распада АТФ в центрах другого типа. Теплота укорочения получается из диссипированной энергии. Предполагается, тем самым, что в двух типах центров действуют две различные актомиозиновые АТФ-азы. Ряд фактов свидетельствует в пользу этих предположений, и теория дает разумное согласие с опытом. Однако проблему нельзя считать решенной, так как теория содержит еще не доказанные постулативные положения.

§ 12.5. Кинетические свойства мышцы

Изложенная количественная теория относится к стационарному мышечному сокращению. Не меньший интерес представляют динамические свойства мышцы в нестационарном режиме. Стационарное сокращение имеет характер пластического тече-

ния. В нестационарных условиях проявляются упругие свойства мышцы. Так, в опытах по быстрому отпуску (quick release), в которых изометрически сокращенная мышца освобождается и испытывает быстрое изотоническое сокращение, наблюдаются медленно затухающие колебания. Частота этих колебаний порядка килогерц для мышц длиною в несколько сантиметров.

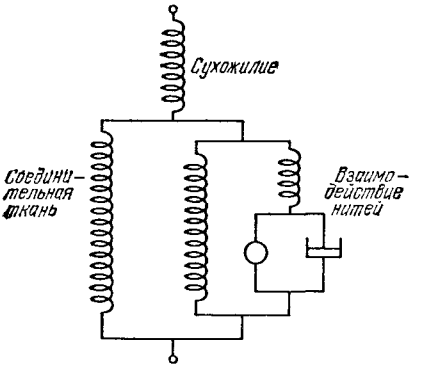


Рис. 12.18. Формальная модель мышцы

При рассмотрении мышцы как вязкоупругого тела можно построить модель, содержащую недемпфированный упругий элемент и последовательно соединенный с ним демпфированный упругий элемент и еще один упругий элемент, параллельный первым двум (рис. 12.18). Такая формальная модель есть комбинация моделей Фойгта и Максвелла. *Модель Фойгта* — упругий элемент, соединенный параллельно с демпфирующим, *модель Максвелла* — те же элементы, соединенные последовательно.

Возникновение колебаний в мышце может определяться нелинейностью нестационарных кинетических уравнений, не содержащих упругости в явном виде. Возможность колебаний обусловлена в этом случае кинетикой замыкания и размыкания мостиков. С другой стороны, сам мостик является вязкоупругой системой. Напряжение, генерируемое замкнутым мостиком, может изменяться шаг за шагом, в зависимости от угла, под которым «головка» ТММ S-1 располагается относительно актина, а также от степени растяжения S-2. Переходы между этими шагами влияют на быстрый нестационарный ответ мышцы. Таким образом, причина колебаний при быстром отпуске состоит в упругой деформации самого мостика. Это наиболее правдоподобное, но еще не доказанное предположение.

Большой интерес для физики и биологии представляют *летательные мышцы насекомых* (ЛМН) и близкие к ним тимпанальные мышцы цикад. Эти мышцы способны к быстрым периодическим сокращениям с частотой порядка 100 Гц. ЛМН структурно весьма сходны с поперечно-полосатыми мышцами позвоночных. Установлена применимость к ЛМН скользящей модели с мостиками актин — миозин.

Быстрые колебания ЛМН требуют наличия непосредственно функционирующего упругого элемента. Микроскопия показывает, что в отличие от мышц позвоночных в ЛМН имеется прямая вязкоупругая связь между миозиновыми нитями и Z-мембранами, осуществляемая специальным элементом С (рис. 12.19). По-ви-

димому, этот элемент способен испытывать упругие деформации.

Установлено большое различие между колебаниями ЛМН и колебаниями потенциала, который на них подается. Так, у мухи частота потенциала, подаваемого на ЛМН, равна 3 Гц, а частота колебаний крыльев достигает 120 Гц. Следовательно, нет активации мышцы при каждом ее колебании. Колебания ЛМН имеют характер *автоколебаний.* Автоколебания возникают в нелинейных системах за счет сил, зависящих от состояния движения самой системы; размах автоколебаний не зависит от начальных условий (см. гл. 15 и 16). Автоколебания ЛМН возбуждаются при наличии обратной связи между деформацией и напряжением. Соотношение между ними изменяется в зависимости от состояния активности системы. По-видимому, в ЛМН имеется «элемент-преобразователь», реагирующий на механические события и контролирующий состояние сократительной системы. Этот элемент локализован в миофибриллах, что доказывается наличием автоколебаний и у препаратов ЛМН, отмытых глицерином.

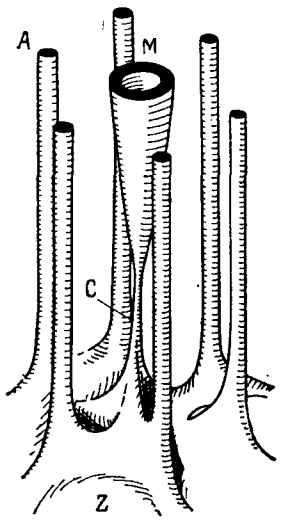


Рис. 12.19. Схема микроскопического строения летательной мышцы насекомого

При одиночном сокращении мышцы позвоночного наблюдается характерная периодичность, «зубчатость» процесса. Это обнаружено оптическим методом (Франк, 1964). Для изучения молекулярной динамики мышцы оказывается очень важным метод скоростной рентгенографии, основанный на применении *синхротронного излучения* (с. 138). Вазиной с сотрудниками удалось провести рентгенографическую «киносъемку» мышцы с разрешением до 0,003 с.

Кинетические свойства мышцы изучены недостаточно. Общий подход к их пониманию должен основываться на теории нелинейных динамических систем (см. гл. 15 и 16).

§ 12.6. Механохимические системы

Мышечное сокращение — лучше всего изученное механохимическое явление. К таким же явлениям относится множество биологических процессов: движения растений; движения клеток с помощью *жгутиков* и *ресничек*; вся совокупность движений в процессах *митоза* и *мейоза*; движения внутри неделящейся клетки; сократительные процессы в хвостах фаговых частиц; механохимические процессы в мембранах; движение рибосом относительно мРНК в полисомах; *акустическая* и *механорецепция*.

Этот неполный перечень показывает, как велико значение механохимии для биологии.

Жгутики и реснички — специальные сократительные системы бактерий и простейших, обеспечивающие их движение в жидкой среде. Реснички функционируют и в ряде органов многоклеточных. Так, гребневики регулируют ориентацию своих тел согласованными движениями ресничек, реснички создают ток

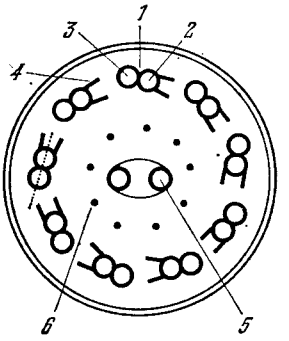


Рис. 12.20. Схема строения поперечного среза жгутика: *1* — периферическая фибрилла, *2* — субфибрилла А, *3* — субфибрилла В, *4* — «ручки», *5* — центральная фибрилла, *6* — вторичная фибрилла

жидкости в жабрах двустворчатых моллюсков, в трахеях человека и т. д.

Жгутики и реснички имеют сходное строение. Это вытянутые образования, длина которых варьирует от нескольких микрометров до нескольких миллиметров, а диаметр — от 0,1 до 0,5 мкм. Электронная микроскопия показала, что жгутик построен из девяти периферических и двух центральных фибрилл (рис. 12.20). Структуры «9 + 2» характерны для многих биологических систем, имеющих фибриллярное строение.

Диаметр центральных фибрилл жгутика около 24 нм, расстояние между их центрами 30 нм. Поперечные размеры каждого из девяти дублетов — периферических фибрилл — 37×25 нм^2. Дублет состоит из двух субфибрилл А и В, от субфибриллы А отходят два отростка — «ручки» — длиной 15 и толщиной 5 нм. Фибриллы — полые цилиндры, стенки которых состоят из 10 протофибрилл с диаметром 3,5 нм.

Белки жгутиков и ресничек пока недостаточно изучены. Установлена их АТФ-азная активность. Формы и частоты волнообразных движений, распространяющихся вдоль жгутика от основания к концу, зависят от концентрации АТФ. Белки являются сократительными, но отличными от миозина или актина.

Модельные теории работы жгутиков и ресничек рассматривают изменения конформационного состояния белковых сократительных единиц, когда до них доходит сократительная волна. В каждой единице происходит расщепление АТФ. В жгутиках и ресничках реализуется скольжение субфибрилл, «ручки» функционируют подобно мостикам в актомиозине мышцы. Детальная молекулярная теория, количественно объясняющая волновое движение жгутиков и ресничек, еще не построена.

Сократительные белки идентифицированы и в других системах. Из сперматозоидов выделен сократительный АТФ-азный белок *спермазин*. В хвостовых структурах бактериофагов, как и в движущихся листьях растений (в частности, мимозы), также содержатся АТФ-азные сократительные белки.

При движении цитоплазмы в клетке водоросли *Nitella* сдвиговая сила генерируется на границе геля и золя. Наблюдается скольжение волокнистых структур относительно окружающего

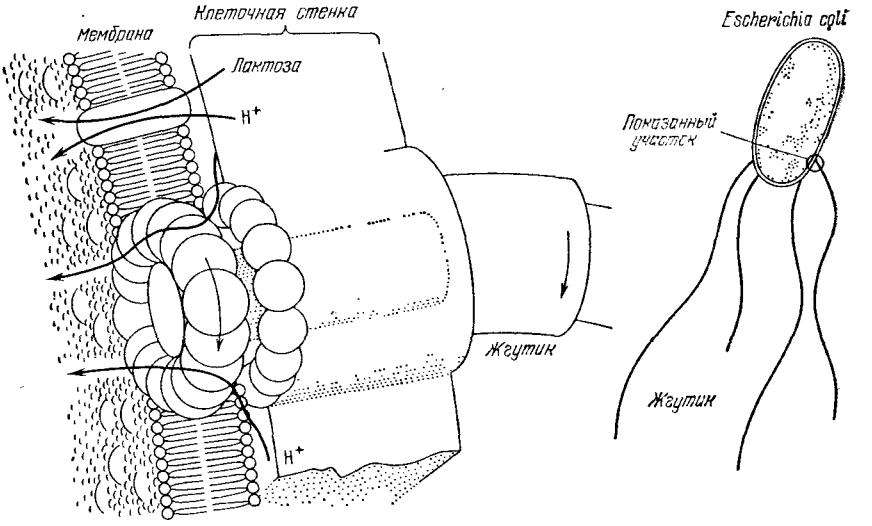


Рис. 12.21. Схема движущего устройства *E. coli*

золя. В амебах обнаружены пучки тонких нитей, выделены актино- и миозиноподобные белки. Можно думать, что за движение цитоплазмы ответственна система актомиозин — АТФ.

При амебоидном движении в псевдоподиях происходит сборка и разборка микротрубочек.

До недавнего времени казалось, что колесо могло быть создано только человеческим разумом — в ходе естественной эволюции не могло возникнуть макроскопическое устройство для вращения вокруг оси. Однако выяснилось, что нечто вроде колеса имеется даже у бактерии *Escherichia coli*. Каждая клетка *E. coli* имеет четыре длинных жгутика. Их вращательные движения позволяют клетке перемещаться. В основании жгутика, расположенном на клеточной стенке и мембране, имеется «колесо» — кольцо из 16 молекул белков в мембране, противостоящее сходному кольцу в клеточной стенке (схематический рис. 12.21). Вращение жгутика в результате вращения кольца, подобного шарикоподшипнику, происходит за счет энергии, выделяющейся при переносе протонов внутрь клетки. Если один протон должен пройти через

каждый белок для поворота жгутика на 360°/16, то для полного оборота требуется 256 протонов.

Плазмодий миксомицетов выполняет активные колебательные движения протоплазмы. Он содержит актин и миозин, весьма сходные с мышечными. Миозин плазмодия, однако, не образует толстых нитей, но лишь малые олигомеры. Тем не менее этот миозин взаимодействует с актином плазмодия. В плазмодии обнаружены тонкие пучки нитей, построенные из актина и миозина. Эти пучки появляются и исчезают, следуя за фазами колебаний. Ток протоплазмы регулируется ионами Ca^{2+}, по-видимому, с участием еще неизвестных регуляторных белков. Можно думать о сходстве движения протоплазмы с мышечным, однако отсутствие толстых нитей означает отсутствие тождества.

При митозе и мейозе происходит перемещение протоплазмы и хромосом. Митотический аппарат клетки состоит из видимых под микроскопом тяжей, соединяющих друг с другом центриоли и хромосомы с центриолями. Центриоли имеют структуру «9 + 2», подобную структуре жгутиков и ресничек. Показано, что жгутики сперматозоидов вырастают из центриолей и кинетохоров хромосом.

Белок митотического аппарата сходен с актином. Добавление АТФ вызывает медленное удлинение митотического аппарата. Пока не ясна непосредственная связь митотических движений с АТФ-азной активностью, и механизм работы митотического аппарата не известен.

Есть основания думать, что цитоплазма с ее *цитоскелетом* обладает свойствами *тиксотропии*. Тиксотропия — фазовые переходы гель $\rightleftarrows$ золь, обратимые или необратимые, происходящие под действием механических сил. Пример тиксотропного тела — обычный кефир, переходящий из твердого состояния (гель) в жидкое (золь) при взбалтывании.

В свое время жидкое содержимое клетки называли протоплазмой. В дальнейшем выяснилось, что это — сложная система, содержащая ряд органелл. Жидкость, в которую погружены органеллы, назвали цитоплазмой. Теперь стало ясно, что и цитоплазма весьма сложна. Она представляет собой вязкоупругий гель, укрепленный *цитоскелетом*, в свою очередь построенным из *микротрубочек*, *промежуточных филаментов* и *микрофиламентов*. Цитоскелет и его элементы — механохимические системы, преобразующие химическую энергию в механическую работу. Цитоскелет состоит из фибриллярных белков, в частности, из *тубулина*. Цитоскелет обеспечивает поддержание формы клетки, одновременно образуя «мускулы», изменяющие эту форму. Функционирование этой «мускулатуры», в ряде отношений сходное с функционированием обычных мышц, регулируется ионами Ca^{2+}. Это, в частности, демонстрируется опытами Камия, изучавшего слизевик *Physarum*. Плазмодий слизевика при определенных условиях колеблется. Установлено, что в этих условиях происходят синхронные колебания концентрации Ca^{2+}.

Поведение цитоплазмы, способной выполнять прямые и обратные переходы гель $\rightleftharpoons$ золь (*цитогель* $\rightleftharpoons$ *цитозоль*), согласуется с механохимической моделью, представляемой уравнениями (Остер):

Вязкоупругое напряжение = вязкие напряжения + + упругие напряжения = f (напряжение, скорость деформации, $[Ca^{2+}]$);

Скорость изменения содержания свободного Ca^{2+} = автокаталитическое освобождение Ca^{2+} из соответствующих везикул — скорость ухода Ca^{2+} в везикулы + утечка, индуцируемая напряжением + поток триггерных химических соединений.

Силы, формирующие зародыш при онтогенетическом развитии, генерируются цитоскелетом. Тем самым изучение механохимии цитоскелета имеет фундаментальное значение для понимания всех процессов индивидуального развития. Для исследования морфогенеза надо понять, как эти силы координируются во всей популяции клеток, с тем чтобы обеспечить правильную последовательность форм тканей. Об онтогенезе рассказано в § 17.9.

Есть все основания думать, что *механорецепция*, а также акустическая рецепция связаны с механохимическими процессами. Возможно, что механорецепция связана с механическим воздействием на ионные каналы в мембранах рецепторных клеток, с деформацией этих каналов. Ионные каналы можно трактовать как «векторные ферменты», преобразующие входящий ион (субстрат) в выходящий (продукт).

Одиночный механорецептор — *тельце Пачини* — изображен схематически на рис. 12.22. В состав рецептора входит нервное окончание, окруженное капсулой, состоящей из периферической и центральной зон. Периферическая зона состоит примерно из 30 замкнутых упругих оболочек. Центральная зона (внутренняя колба) содержит 60 плотно уложенных цитоплазматических слоев, разделенных «щелью», ориентированной вдоль длинной оси эллиптического сечения нервного окончания. Модуль упругости оболочек периферической зоны составляет около 10^6 г/см^2 (108 Па), оболочки способны различать механическую силу в диапазоне 150—200 дин ($(1{,}5—2)\cdot 10^{-3}$ Н).

Тельца Пачини преобразуют механическое воздействие в нервные импульсы. В этом смысле их функция противоположна функции мышцы. Черниговский и сотрудники (1970) изучали характеристики этих преобразований. Максимальная чувствительность регистрируется для частоты 100—220 Гц, оптимальная частота следования потенциала действия совпадает с этим значением. Реализуется своего рода «биомеханический резонанс». Собственный период возбуждения рецептора составляет 9,6 мс, что соответствует той же периодичности раздражений порядка

100 Гц. Высказано предположение о том, что регулирование проницаемости плазматической мембраны нервного окончания связано с участием сократительных белков. Установлено, что активный участок нервного окончания в области «щели» играет доминирующую роль в возникновении возбуждения. Показано, что в этой области происходит расщепление АТФ. Можно думать, что мембрана содержит ориентированные молекулы белка, обладающие АТФ-азной активностью. Механический стимул вызывает конформационные изменения в этих молекулах и, следовательно, изменения их АТФ-азной активности.

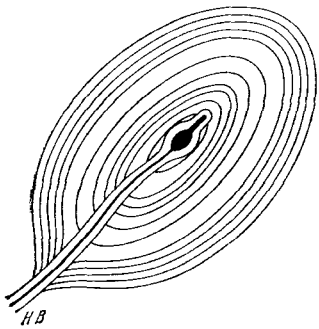


Рис. 12.22. Схема тельца Пачини (*нв* — нервное волокно)

Наиболее общее положение биологической механохимии состоит в ее обязательной связи с ферментативной активностью рабочих веществ — сократительных и регуляторных белков. Как мы видели (гл. 6), ферментативная активность определяется конформационными свойствами белка, электронно-конформационными взаимодействиями. Отсюда следует, что принудительное конформационное изменение, вызванное механическим воздействием на белок, должно менять его ферментативную активность. Это доказано прямыми опытами. При деформации миозина в гидродинамическом поле динамооптиметра (с. 83) меняется его АТФ-азная активность. Ультразвук сильно влияет на активность ферментов.

В принципе сходные процессы реализуются, вероятно, и при акустической рецепции.

Сократительные белки, прежде всего актин, фигурируют и в ряде других клеток и тканей. Актин составляет около 20% всего белка в нейронах цыпленка. Актин или актиноподобный белок присутствует в эмбриональной линзе, легких, коже, сердце, поджелудочной железе, почках и в мозговой ткани цыпленка. Актино- и миозиноподобные белки выделены из тромбостенина, из комплекса сократительных белков в тромбоцитах человека.

Эти факты подтверждают общее положение о необходимости механического движения в жизненных процессах и о сходстве механизмов этого движения в самых разнообразных биологических системах.

§ 12.7. Слуховая рецепция

К механохимическим процессам сводится и слуховая, акустическая рецепция. Трансформации продольных звуковых волн в нервные импульсы предшествует ряд процессов, на которых здесь следует остановиться.

Слухом обладают сравнительно немногие позвоночные. Устройство органа слуха человека и других млекопитающих сходно; оно показано на рис. 12.23. Ухо служит слуховым органом и органом равновесия. Ухо принято разделять на *наружное*, *среднее* и *внутреннее*. Наружное ухо состоит из ушной раковины и слухового прохода. Задача наружного уха — направить звуковую

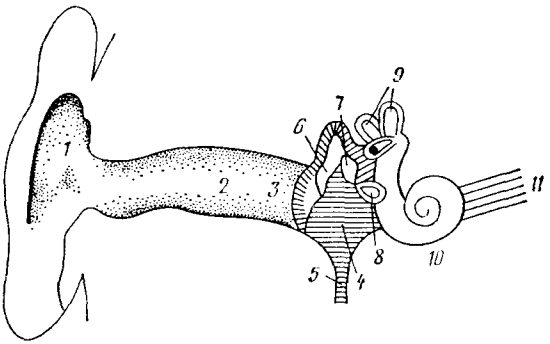


Рис. 12.23. Схема уха человека: *1* — наружное ухо, *2* — слуховой канал, *3* — барабанная перепонка, *4* — полость среднего уха, *5* — евстахиева труба, *6* — молоточек, *7* — наковальня, *8* — стремечко, *9* — полукружные каналы, *10* — улитка, *11* — слуховой нерв

энергию должным образом и защитить среднее и внутреннее ухо от внешней среды. Эти части отделены от наружного уха тонкой соединительнотканевой мембраной — *барабанной перепонкой*, колеблющейся под действием звуковых волн. Среднее ухо — небольшая камера, содержащая три миниатюрных очень твердых косточки — *молоточек*, соприкасающийся с барабанной перепонкой, *наковальню и стремя*, соприкасающееся с мембраной овального окна — отверстия, ведущего во внутреннее ухо. Среднее ухо соединяется с носоглоткой *евстахиевой трубой*, которая служит для выравнивания давления по обе стороны барабанной перепонки.

Эволюционное происхождение уха своеобразно. Среднее ухо и евстахиева труба были исходно частью дыхательного аппарата рыб, три функциональных косточки изначально были частью опорного аппарата бесчелюстных (круглоротые — миноги и миксины). Что касается клеток, чувствительных к звуку, то они, по-видимому, возникли из клеток, чувствительных к движению жидкости. Все это — яркие примеры эволюционной перестройки старых органов для выполнения новых функций.

Внутреннее ухо состоит из сложной системы каналов и полостей — лабиринта, часть которого, именуемая *улиткой*, представляет собой спирально закрученную трубку длиной примерно в 3,5 см, имеющую 2,5 витка. Внутреннее ухо наполнено жидкостью — лимфой. Улитка состоит из трех, разделенных тонкими перепонками каналов. Упомянутое овальное окно находится

у основания одного из этих каналов. У основания другого имеется второе отверстие — круглое окно, также закрытое мембраной и ведущее в среднее ухо. Третий канал — канал улитки — содержит рецептор звука — *кортиев орган*, состоящий примерно из 24 000 чувствительных клеток с выступающими из них волосками. Эти клетки располагаются на *базилярной мембране.*

Во внутреннем ухе звуковые волны, распространявшиеся в воздухе, преобразуются в продольные колебания лимфы. Сопротивление звука ρv (ρ — плотность среды, v — скорость звука) в воздухе в 1000 раз меньше, чем в воде (в лимфе). Колебания в воздухе должны быть преобразованы в колебания лимфы так, чтобы сопротивления совпали. Это происходит в среднем ухе. Барабанная перепонка улавливает воздушные колебания и посредством названных косточек трансформирует звуковые волны таким образом, что уменьшается амплитуда звуковых колебаний, но увеличивается их давление. Трансформаторная функция уха отвечает отношению площадей барабанной перепонки и овального окна. Определяющее значение имеет высокая твердость косточек системы. У человека в области частот порядка 1 кГц барабанная перепонка, нагруженная косточками и внутренним ухом, оказывается приспособленной к акустическому сопротивлению воздуха.

Фон Бекеши подтвердил представления, выдвинутые еще Гельмгольцем, о локализации высоко- и низкочастотных колебаний в различных областях улитки. Микроскопия кортиева органа показывает, что волокна базилярной мембраны имеют разную длину в разных участках завитков улитки — устройство внутреннего уха в этом отношении сходно с арфой или фортепиано. Соответственно работа системы основывается на резонансе колебаний в определенном участке базилярной мембраны и воздействии на соответствующие волосковые клетки. Волна давления вызывает в конечном счете раздражение этих волосковых клеток и нервные импульсы.

Фон Бекеши установил, что в ухе возникают бегущие, а не стоячие волны. Бегущие волны поперечного отклонения базилярной мембраны начинаются с очень малой амплитудой у овального окна, медленно нарастают, достигают максимума в определенном месте, а затем быстро убывают. Разным частотам отвечают разные формы бегущих волн — пространственное положение максимальной амплитуды изменяется с частотой звука, смещаясь к овальной мембране с повышением частоты. Таким образом производится первичный частотный анализ.

В опытах фон Бекеши базилярная мембрана покрывалась серебряным порошком и амплитуда колебаний определялась по размытию изображения с помощью микроскопа. Задавая амплитуду колебаний барабанной перепонки (в миллионы раз большую, чем при действии пороговых звуковых колебаний), фон Бекеши путем экстраполяции оценил пороговую амплитуду колебаний базилярной мембраны. Она оказалась фантастически ма-

лой — порядка тысячных долей нанометра, т. е. на несколько порядков меньше размеров атома. Речь идет о смещении большого участка мембраны, усредненного по пространству, т. е. по многим атомам и по времени. Показано, что эти смещения заметно превосходят определяемые тепловым шумом.

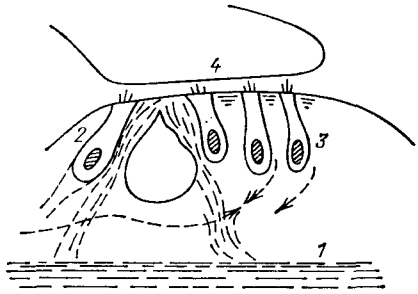


Рис. 12.24. Схема функционирования волосковых клеток: *1* — базилярная мембрана, 2 — внутренняя волосковая клетка, *3* — три внешние волосковые клетки, *4* — покровная мембрана

На рис. 12.24 показана схема функционирования чувствительных волосковых клеток (их диаметр ~10 мкм, длина ~50 мкм, длина волосков ~3 мкм). Основания клеток фиксированы на базилярной мембране, концы волосков — на специальной покровной мембране. При колебаниях базилярной мембраны клетки

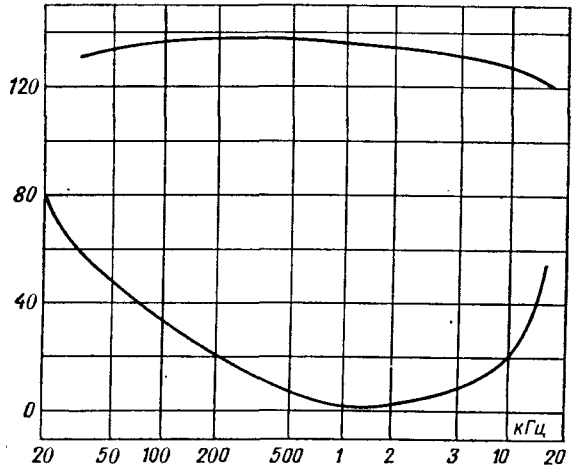


Рис. 12.25. Диаграмма слышимости для человека. По оси абсцисс — частоты, по оси ординат — уровни интенсивности по отношению к $2 \cdot 10^{-4}$ дин/см^2 (децибел). Нижняя кривая — уровень слышимости, верхняя — уровень болевого ощущении

перемещаются и изгибаются волоски — стереоцилии. Это движение передается окончаниям нервных клеток и вызывает появление нервного импульса.

Согласно Пасечнику, элементарным механочувствительным устройством служит ионный канал клеточной мембраны. Его ре-

акция на растяжение мембраны сводится к изменению вероятностей переходов между закрытым и открытым состояниями канала. Действительно, удалось показать экспериментально, что изгиб волосков приводит к деполяризации мембраны, сопровождаемой возрастанием электрического шума. Одна стереоцилия управляет сорока ионными каналами. Удалось моделировать эти механохимические явления с помощью искусственной бислойной липидной мембраны, в которую встроены ионные каналы.

Остается, однако, неясным, как при этом срабатывает K-, Na-активируемая АТФ-аза. Можно думать, что этот процесс подобен происходящему при осязательной рецепции — в тельцах Пачини (с. 415).

Слух означает способность различать частоты и интенсивности звуковых колебаний. Частотный диапазон слышимости варьирует в широких пределах у разных организмов. Так, кузнечик реагирует на звуки с частотой от 10 Гц до 100 кГц, лягушка — от 50 Гц до 30 кГц. Верхняя граница восприятия звука у птиц лежит около 15—20 кГц, у летучих мышей — от 100 до 150 кГц. На рис. 12.25 приведена диаграмма слышимости для человека. В отличие от ряда животных, человек к ультразвуку не восприимчив.

§ 12.8. Биомеханика

С механохимическими явлениями непосредственно связана область биологии и физики, именуемая биомеханикой. Здесь мы ограничимся кратким перечнем проблем биомеханики.

Движения позвоночных животных определяются поведением сложной системы мышц, сухожилий и костей. Изучение этих движений требует решения ряда задач механики сложносочлененной системы, гидро- и аэродинамики, автоматического регулирования. Движущаяся система животного содержит как жесткие (внутренний скелет позвоночных, внешний хитиновый скелет членистоногих), так и гибкие участки. Последние работают прежде всего в сочленениях. Соответствующие системы образуют *кинематические цепи*, т. е. совокупности звеньев, соединенных таким способом, что если одно из них закрепить, а какое-то другое привести в движение, то все остальные должны будут двигаться предписанным образом. Кинематические цепи образуют и конечности, и черепа кинетического типа у многих ящериц, змей и птиц. Кинетические черепа содержат подвижные сочленения.

Задача техники состоит в конструировании механизмов, способных совершать определенные движения. Биологи часто встречаются с обратной задачей — понять механизм, лежащий в основе наблюдаемого движения. Механизмы эти, созданные природой, весьма сложны, как о том свидетельствует, например, действующая модель крыльев мухи (рис. 12.26).

Механические свойства материалов и устройств, используемых организмами для движения, разнообразны. Внутренний и внешний скелеты должны обладать определенной прочностью. Так, например, череп дятла построен специальным способом, обеспечивающим амортизацию мозга птицы при сильных ударах

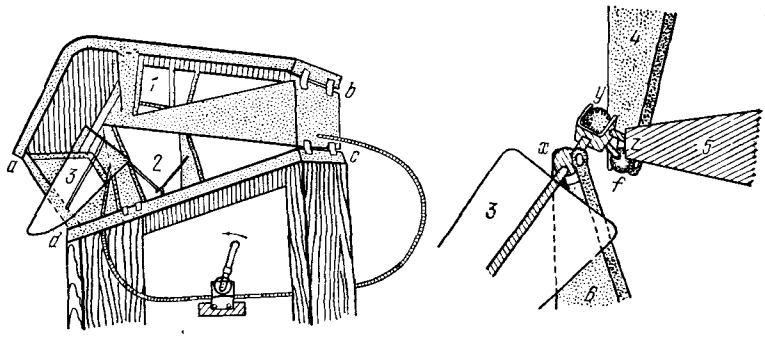


Рис. 12.26. Действующая модель, объясняющая механизм движения крыльев мухи: *1* — проволока, изображающая продольную спинную мышцу, *2* — резинка, изображающая плейростериальную мышцу, *3* — крыло, *4* — тергит, *5* — плечо скутеллума, *6* — плейрит, *x*, *y*, *z*, *f* — шарниры

клювом. Кости позвоночных построены из микроскопических кристаллов *гидроксиапатита* $3\,Ca_3(PO_4)_2 \cdot Ca(OH)_2$, погруженных в фибриллярную коллагеновую структуру. Коллаген обеспечивает высокую прочность на изгиб.

Коллаген, сократительные и другие белки, участвующие в движениях животных, обладают специфическими вязкоупругими свойствами. У позвоночных в стенках артерий и в других органах содержится *эластин*, свойства которого сходны со свойствами резины. Эластин обладает высокоэластичностью, природа которой, как и у каучука, энтропийная (см. § 3.1). У насекомых в грудном отделе содержится белок *резилин*, также обладающий каучукоподобными свойствами — его модуль упругости близок к модулю упругости резины, и упругость практически целиком энтропийная. При полете саранчи бóльшая часть кинетической энергии, отнимаемой у крыльев в конце их подъема, переходит в потенциальную энергию упругой деформации резилина, затем эта энергия вновь переходит в кинетическую энергию опускаемых крыльев. При прыжке блохи ее задняя нога, поднимаясь, сжимает комочек резилина. Она поднимается сравнительно медленно в результате сокращения мышцы, а затем резко освобождается особым спусковым устройством. Резилин срабатывает, как резина в рогатке.

Вязкоупругие свойства белковых материалов очень важны для движений как позвоночных, так и беспозвоночных.

Движение животных в воздухе и в воде определяется эволюционным развитием биологических систем, приспособленных

к решениям задач аэро- и гидродинамики, в ряде случаев пока недоступных искусственным устройствам. Кожа дельфина обладает специальными свойствами, позволяющими уменьшать лобовое сопротивление движению животного. Машущий и планирующий полет птиц послужил образцом для построеиия летательных аппаратов человеком. Область науки, посвященная техническому применению механизмов, развитых живой природой, именуется *бионикой*. Она была начата Леонардо да Винчи, проектировавшим крылья для полета человека. Он же был основоположником биомеханики в целом, впервые изучавшим ходьбу, бег и прыжки человека.

К биомеханике относится и рецепция механических колебаний и ориентации тела органами равновесия (отолитовые органы в ухе).

Биомеханические исследования очень существенны для техники и для медицины, в частности, в связи с невесомостью в космических полетах. Укажем, например, на протеэ руки, работающий от биотоков (Гурфинкель). Биомеханика — одна из важных областей биофизики, но ее подробное изложение выходит за рамки этой книги.

Глава 13

БИОЭНЕРГЕТИКА ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ

§ 13.1. Биологическое окисление

Биоэнергетические процессы, приводящие к синтезу АТФ, к «зарядке биологических аккумуляторов», протекают в мембранах *митохондрий*. В них локализованы и пространственно организованы молекулярные системы, ответственные за энергетику живых организмов. Синтез АТФ в митохондриях сопряжен с электронным и ионным транспортом и с механохимическими явлениями. Функции митохондриальных мембран весьма сложны и многообразны. Другой тип биоэнергетических сопрягающих мембран — мембраны хлоропластов растений, ответственные за фотосинтез,— рассматривается в гл. 14. У бактерий сопряжение реализуется в плазматических мембранах.

Источником энергии, расходуемой клеткой на все ее нужды, является дыхание, т. е. окисление органических соединений кислородом воздуха. В 1780 г. Лавуазье показал, что дыхание и горение имеют единую природу. За последние два столетия исследования химиков, биологов и физиков привели к раскрытию основных особенностей биологического окисления.

«Топливо», т. е. окисляемые вещества, поступает в организм животного с пищей в виде жиров, углеводов и белков. Они расщепляются, т. е. гидролизуются в реакциях, катализируемых специальными ферментами,— жирные кислоты активируются с участием ферментов и АТФ, превращаясь в ацилпроизводные кофермента А (с. 42). Окисление ацилпроизводного КоА-SH происходит в ряде стадий, на каждой из которых образуется остаток жирной кислоты, содержащей на два атома углерода меньше, чем предыдущий. Полное уравнение реакции окисления жирной кислоты с четным числом атомов углерода до ацетил-S-КоА имеет вид

$$H_3C(CH_2CH_2)_n CO_2H + АТФ + (n+1)\,КоА\text{-}SH + n\,НАД^+ + n\,E\cdot ФАД + n\,H_2O \rightarrow (n+1)\,H_3C\,COS\text{-}КоА + \begin{pmatrix} АДФ + Ф_н \\ АМФ + ФФ_н \end{pmatrix} + n\,НАД.H + n\,E\cdot Восст.\,ФАД + n\,H^+.$$

Здесь НАД — кофермент никотинамидадениндинуклеотид (с. 41), Е — фермент, ФАД — кофермент флавинадениндинуклеотид. При разрушении жиров в конечном счете образуется ацетил-КоА, а также пропионил-КоА и глицерин.

Расщепление и окисление углеводов (в частности, крахмала) приводят к образованию триозофосфатов и пировиноградной кислоты (пирувата). При разрушении белков, наряду с индивидуальными аминокислотами, образуются ацетил-КоА, оксалоацетат,

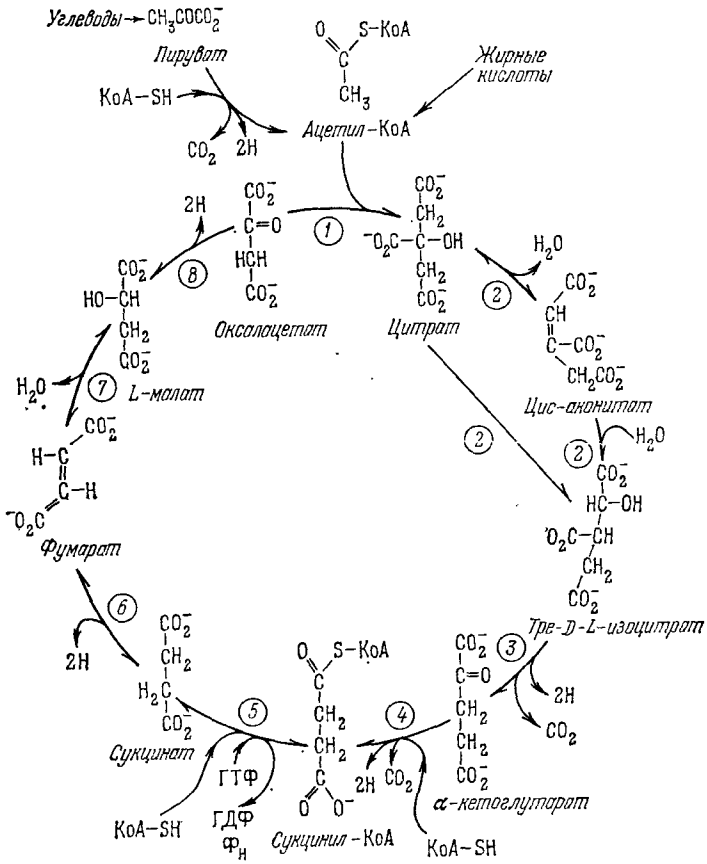


Рис. 13.1. Цикл Кребса

α-кетоглутарат, фумарат и сукцинат (янтарная кислота). Эти процессы метаболизма детально изучены в современной биохимии (§ 2.10).

Полученные вещества претерпевают дальнейшие превращения в циклической системе реакций, именуемой циклом лимонной кислоты (или циклом трикарбоновых кислот) или *циклом Кребса*. Эта система локализована в митохондриях.

Цикл Кребса изображен на рис. 13.1. За один оборот цикла, состоящего из восьми реакций, отмеченных на рисунке цифрами, происходит деградация одной молекулы ацетил-КоА или одной молекулы пирувата до CO_2 и H_2O, т. е. «сгорание» этих молекул.

От цикла Кребса идут пути многих биосинтетических реакций — синтеза углеводов, липидов, пуринов, пиримидинов и порфиринов. Синтез белков также связан с циклом, в котором создаются предшественники ряда аминокислот. В то же время биологическое окисление служит источником энергии, запасаемой в АТФ.

В реакциях цикла возникают CO_2 и ионы H^+. Одновременно происходит восстановление коферментов НАД. Для непрерывного и полного биологического окисления эти коферменты должны

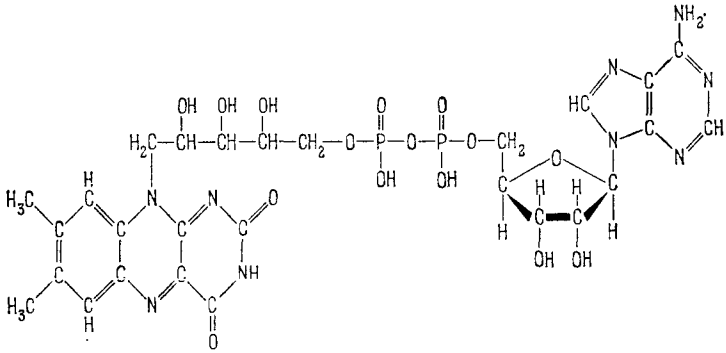


Рис. 13.2. Флавинадениндинуклеотид (ФАД)

окисляться вновь. Окисление осуществляется совокупностью переносчиков электронов, образующих *дыхательную цепь* или *цепь переноса электронов* (ЦПЭ). ЦПЭ обеспечивает реакцию

$$3НАД.Н + 1{,}5O_2 + 3H^+ \rightarrow 3НАД^+ + 3H_2O - 3 \cdot 220{,}1 \text{ кДж/моль.}$$

Реакция ацетил-КоА имеет вид

$$Ацетил\text{-}S\text{-}КоА + 3O_2 \rightarrow 3CO_2 + 2H_2O + HS\text{-}КоА - 903{,}9 \text{ кДж/моль.}$$

ЦПЭ — полиферментная система, акцептирующая электроны из цикла Кребса и цикла окисления жирных кислот. Электрон переносится по цепи

$$\text{Субстрат} \rightarrow НАД \rightarrow ФМН,\ FeS\text{-белок} \rightarrow Убихинон \rightarrow Цитохром\ b \rightarrow$$
$$\text{Сукцинат} \rightarrow ФМН,\ FeS\text{-белок} \rightarrow Убихинон \nearrow$$
$$\rightarrow Цитохром\ c_1 \rightarrow Цитохром\ c \rightarrow Цитохромы\ a + a_3 \rightarrow O_2.$$

Флавопротеиды — ферменты, содержащие флавиновые коферменты — ФАД (рис. 13.2) и флавин-мононуклеотид ФМН, рибофлавин-5′-фосфат. Цитохромы содержат группу гема, атом железа которого при работе цепи подвергается окислению и восстановлению:

$$Fe^{2+} \rightleftarrows Fe^{3+} + e^-.$$

FeS-белок содержит железо и серу, это белок типа ферредоксина. Перенос электронов с приведенной цепи происходит слева направо, завершаясь восстановлением кислорода, который соединяется с H^+ и образует воду. Освобождаемый при окислении электрон соединяется со следующим звеном цепи. Перенос электронов сопровождается изменением свободной энергии, так как электроны перемещаются по каскаду возрастающих окислительно-восстановительных потенциалов. Их значения приведены в табл. 13.1.

Таблица 13.1. **Окислительно-восстановительные потенциалы**

Система	φ, В	Система	φ, В
$H_2O/^1/_2\,O_2$	0,82	Восст. флавин/флавин	—0,185
Цит. a Fe^{2+}/Fe^{3+}	0,29	Лактат/пируват	—0,19
Цит. c Fe^{2+}/Fe^{3+}	0,23	Восст. НАД/НАД	—0,32
Цит. c_1 Fe^{2+}/Fe^{3+}	0,21	Малат/пируват	—0.33
Цит. b Fe^{2+}/Fe^{3+}	0,05	$^1/_2H_2/H$	—0,42
Сукцинат/фумарат	0,03	Ацетальдегид/ацетат	—0,60
Глутамат/α-кетоглутарат	—0,14		

Перенос электронов сопряжен с запасанием энергии в молекулах АТФ. Иными словами, освобождаемая свободная энергия конвертируется в химическую энергию АТФ. Происходит окислительное фосфорилирование.

Это важнейшее явление открыто Энгельгардтом в 1930 г. Белицер и Цыбакова (1939) провели первые определения коэффициента Ф : О, т. е. отношения числа молекул этерифицированного неорганического фосфата к числу атомов поглощенного кислорода, и установили, что значение этого коэффициента не менее двух. В дальнейшем выяснилось, что этот коэффициент в окислительных реакциях цикла Кребса и реакций с участием НАД может достигать пяти.

Ленинджер установил, что процессы окислительного фосфорилирования локализованы именно в митохондриях, и в его работах были определены узловые пункты дыхательной цепи, в которых происходит фосфорилирование. Указанное значение Ф : О следует из уравнения

$$НАД.Н + Н^+ + 3Ф_н + 3АДФ + 0{,}5O_2 \rightarrow НАД + 4H_2O + 3АТФ.$$

В этом уравнении суммируются экзергоническая реакция

$$НАД.Н + Н^+ + 0{,}5O_2 \rightarrow НАД^+ + H_2O + 221{,}3\ кДж/моль$$

и эндергоническая реакция

$$3АДФ + 3Ф_н \rightarrow 3АТФ + 3H_2O - 92{,}0\ кДж/моль.$$

Фосфорилирование происходит в трех узловых пунктах — в участке цепи НАД.Н → флавопротеид, в участках цитохром b → цитохром c_1 и цитохром c → цитохромы $a + a_3$.

Общая схема сопряжения окисления с фосфорилированием приведена на рис. 13.3.

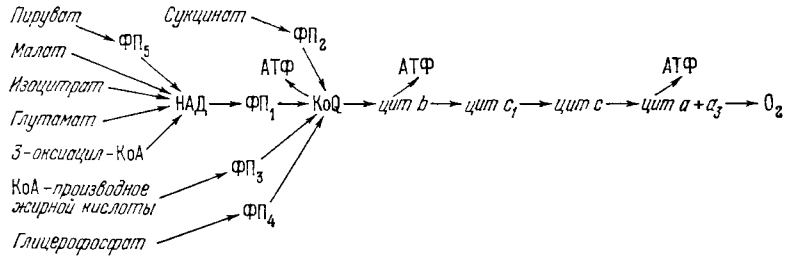


Рис. 13.3. Дыхательная цепь. Прямые стрелки указывают места вхождения электронов; *ФП* — флавопротеиды, KoQ — кофермент *Q*

Напишем вновь брутто-уравнение

$$\text{АДФ} + \Phi^- + H^+ \rightleftarrows \text{АТФ} + H_2O - \Delta G.$$

Изменение свободной энергии ΔG равно

$$\Delta G = \Delta G_0 + RT \ln \frac{[\text{АДФ}]\,[H_2PO_4^-]\,[H^+]}{[\text{АТФ}]\,[H_2O]}, \qquad (13.1)$$

где

$$\Delta G_0 = -RT \ln K \approx 30{,}7 \text{ кДж/моль},$$

K — константа равновесия при концентрациях в 0,1М, pH 7,0, 25 °С. При изменениях pH и ионной силы ΔG меняется.

Изменение свободной энергии при переносе двух электронных эквивалентов по ЦПЭ от НАД.Н к O_2 определяется разностью окислительно-восстановительных потенциалов $0{,}82 - (-0{,}32) = 1{,}14$ (В), т. е.

$$\Delta G = z\Delta\psi = -2 \cdot 23{,}06 \cdot 4{,}79 \text{ кДж/моль} = -221{,}3 \text{ кДж/моль}.$$

Это обеспечивает с избытком синтез трех молей АТФ. Эффективность процесса равна 92/221,3 (т. е. ~40%). Энергия, аккумулированная в АТФ, используется клеткой для выполнения химической, электрической, транспортной и механической работы.

Раскрытие химизма биологического окисления — крупнейшее достижение биохимии.

Особенность системы *окислительного фосфорилирования*, отличающая ее от ферментативных реакций в растворе, состоит в пространственной локализации звеньев многоступенчатого процесса. Окислительное фосфорилирование локализовано в митохондриях и непосредственно связано с функциональностью их мембран.

Расшифровка кратко описанных здесь окислительно-восстановительных реакций была получена в результате применения тонких химических и физических методов. Здесь, в частности,

сыграли большую роль работы Чанса, посвященные спектроскопии переносчиков электронов (НАД, ФП, цитохромов) в интактных митохондриях. Эти переносчики обладают характерными полосами поглощения в видимой и в близкой ультрафиолетовой областях спектра. Разностные спектры позволяют изучать кинетику их окисления и восстановления. Были применены различные способы удаления из митохондрий специфических ферментов и тем самым сохранения лишь определенных звеньев процесса.

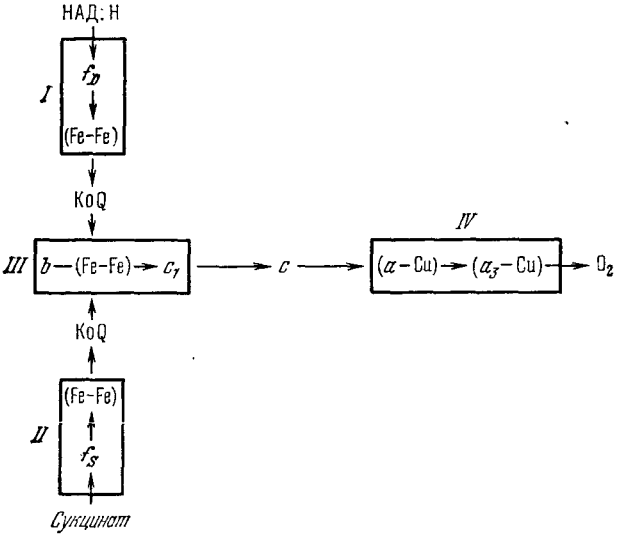


Рис. 13.4. Распределение белков по компонентам ЦПЭ *I*, *II*, *III*, *IV*: *a*, *b*, *c*, c_1, a_3 — цитохромы, Cu — медьсодержащие белки, (Fe-Fe) — негеминовое железо, f_s — сукцинатдегидрогеназа, f_D — НАД·Н-дегидрогеназа

Митохондрии подвергались расчленению, из *субмитохондриальных частиц* (СМЧ) выделялись комплексы дыхательных ферментов, свободные от структурных белков. Такие комплексы оказалось возможным очищать и детально исследовать. Были проведены успешные опыты по восстановлению ЦПЭ из выделенных препаратов и растворимых ферментов. Наконец, очень ценная информация была получена в опытах по ингибированию отдельных стадий процесса и по разобщению окислительного фосфорилирования и переноса электронов.

В основном переносчики ЦПЭ сгруппированы в четыре комплекса, именуемые *комплексами Грина*. Соответствующая схема показана на рис. 13.4. Примерные молекулярные массы комплексов: I — $6 \cdot 10^5$, II — $1{,}2 \cdot 10^5$, III — $2 \cdot 10^5$, IV — $2 \cdot 10^5$.

Электрон-переносящий комплекс определяется как минимальная единица ЦПЭ, сохраняющая способность переносить электрон со скоростью, сравнимой с таковой в интактных митохондриях.

Строение и функциональная организация митохондрий явились предметом интенсивного изучения. Тем не менее, многие важнейшие вопросы, сюда относящиеся, пока не имеют ответа. Специфическая мембранная структура митохондрий, присутствие в них автономной программы синтеза белков (ДНК), механохимическая активность митохондрий непосредственно связаны с их ролью «силовых станций» клетки.

§ 13.2. Строение и свойства митохондрий

Митохондрии фигурируют во всех аэробных клетках животных и растений, за исключением некоторых примитивных бактерий, в которых функции митохондрий выполняет плазматическая мембрана. Число этих органоидов в клетке различно — от 20—24 в сперматозоидах до 500 000 в клетке гигантской амебы *Chaos chaos*. Число митохондрий характерно для клеток данного вида, по-видимому, при митозе происходит деление митохондрий и их правильное расхождение в дочерние клетки. Во многих клетках митохондрии образуют непрерывную сеть — митохондриальный ретикулум. Форма, структура и размеры митохондрий также варьируют. Они всегда обладают системой внутренних мембран, именуемых *кристами*. На рис. 13.5 схематически изображена структура митохондрии из печени крысы. Длина ее примерно 3 мкм, ширина 0,5—1 мкм. Поэтому она хорошо видна в оптическом микроскопе. Средняя сухая масса 10^{-13} г. Общая площадь поверхности всех крист составляет 16 мкм^2, внешней мембраны — 13 мкм^2. В клетке печени содержится примерно 1000 митохондрий, значит, полная поверхность митохондриальных мембран равна примерно 29 000 мкм^2, что в десять раз превышает поверхность мембраны самой клетки. Внутренность митохондрии, не занятая кристами, заполнена *матриксом*. Митохондрии содержат так называемые «плотные гранулы», по-видимому, возникающие путем аккумуляции различных ионов, в частности Ca^{2+}.

В митохондриях обнаружена ДНК, в них происходит ДНК-зависимый синтез РНК. В митохондриях представлена вся система биосинтеза белка — в них содержатся тРНК, аминоацил-тРНК-синтетазы и рибосомы.

Мембраны митохондрий тоньше большинства клеточных мембран — их толщина порядка 5 нм. Методами электронной микроскопии установлено, что внутренние мембраны и кристы покрыты сферическими или полиэдрическими частицами диаметром 8—10 нм, прикрепленными к мембранам ножками, имеющими размер (2—4)×(4—5) нм^2. Эти структурные элементы весьма многочисленны, до 10^4—10^5 в одной митохондрии, и занимают 10—15% ее объема. На рис. 13.6 показано электронно-микроскопическое изображение крист в митохондрии; видны эти элементарные частицы. Не исключено, однако, что они являются артефактом, возникающим при негативном контрастировании.

Митохондрии содержат 50—60 ферментов, катализирующих реакции ЦПЭ и т. д.

Липиды составляют от 15 до 50% сухой массы митохондрий; 90% липидов — фосфолипиды.

Локализация окислительных ферментов в митохондриях изучалась при разрушении митохондрий детергентами или ультразвуком. Цитохромы и флавопротеиды дыхательной цепи обнару-

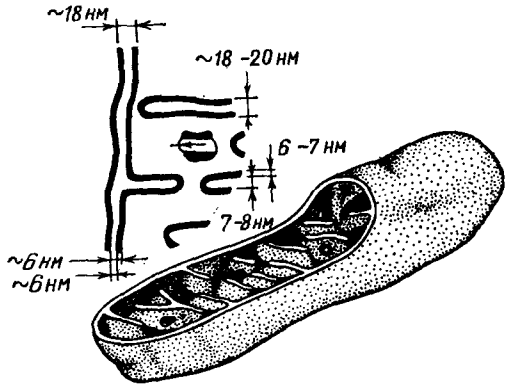


Рис. 13.5. Схематическое изображение митохондрии

живаются в нерастворимых частицах, по-видимому, принадлежащих мембранам. Напротив, ферменты цикла Кребса (дегидрогеназы и др.) содержатся в растворимой части. Отсюда можно сделать заключение, что они локализованы вблизи крист или на них, но легко отделяются.

Кристы образованы впячиванием внутренних мембран. Число и поверхность крист непосредственно связаны с интенсивностью

Рис. 13.6. Электронная микрофотография крист. Верхняя стрелка указывает головку, нижняя — подставку элементарной частицы

клеточного дыхания. Их формы широко варьируют. Митохондрии летательных мышц насекомых содержат развитую поверхность плотно упакованных крист; интенсивность дыхания этих

клеток раз в 20 выше, чем клеток печени, митохондрии которых содержат относительно мало крист. Митохондрия клетки печени содержит примерно 17 000 дыхательных ансамблей, как это следует из количества цитохромов. На каждый мкм^2 поверхности внутренней мембраны приходится 650 ансамблей, каждый ансамбль занимает площадь 40×40 нм^2.

Фазово-контрастная микроскопия показывает, что митохондрии живых клеток испытывают изменения размеров и формы, связанные с дыханием. Происходят циклы набухания и сокращения двух типов. Обратимый цикл малой амплитуды, в котором объем меняется на 1—2%, наблюдается у всех видов митохондрий *in vitro*. Набухание происходит в отсутствие АДФ в состоянии покоя. При добавлении АДФ происходит сокращение и окислительное фосфорилирование АДФ. Цикл блокируется *разобщителями* окислительного фосфорилирования.

В цикле большой амплитуды объем митохондрии может меняться в несколько раз. Это наблюдается как *in vitro*, так и *in vivo*. Сокращение митохондрий вызывается добавлением АТФ. Процесс непосредственно связан с дыханием — с окислительным фосфорилированием. Наблюдается прямой параллелизм в ингибировании сокращения и окислительного фосфорилирования олигомицином.

Эти механохимические процессы сводятся к превращению химической энергии в механическую работу. Имеется далеко идущее сходство АТФ-азной активности митохондриальных мембран и актомиозиновой сократительной системы скелетных мышц. Сходны их механохимические свойства — сокращение под действием АТФ. Можно было думать, что в мембранах митохондрий присутствуют сократительные белки, подобные актомиозину. Эта гипотеза была подтверждена — сократительный белок удалось выделить из митохондрий. Показано, что сократительные белки участвуют в митохондриальной механохимии, но оказалось, что здесь играет существенную роль и липид мембран — фосфатидилинозитол.

В работах школы Ленинджера было показано непосредственное участие транспорта катионов в функционировании мембран митохондрий. Накопление больших количеств Ca^{2+}, поступающего из окружающей среды, происходит при дыхании и блокируется его ингибиторами и разобщителями окислительного фосфорилирования. Поступление Ca^{2+} связано с количеством поглощаемого кислорода, фосфат также аккумулируется параллельно накоплению Ca^{2+} в отношении $Ca^{2+} : Ф_н = 1{,}67$ (соответствующем оксиапатиту). Электронная микроскопия показывает, что в митохондриях могут накапливаться гранулы фосфата кальция.

Имеется прямое и точное соотношение между аккумулированными количествами $Ф_н$ и Ca^{2+} и числом электронов, проходящих по ЦПЭ. При перемещении каждой пары электронов через каждый из трех центров накопления энергии в цепи аккумулируется 1,67 ионов Ca^{2+} и одна молекула $Ф_н$. Этот процесс альтер-

нативен окислительному фосфорилированию. Тем самым Ca^{2+} действует как его *разобщитель*.

Малые количества Ca^{2+}, напротив, стимулируют дыхательный процесс. Транспорт Ca^{2+} связан с транспортом катионов H^+, K^+ и Na^+.

§ 13.3. Хемиосмотическое сопряжение

Как уже сказано, окислительное фосфорилирование в митохондриях сопряжено с ионным транспортом. Это система сопряженных процессов, а не отдельная химическая реакция. Слэйтер (1953) предположил, что в результате окисления возникают *первичные макроэрги* — промежуточные вещества, обладающие избытком свободной энергии и участвующие в фосфорилировании. Такие вещества не были обнаружены и физический механизм предлагаемого процесса не ясен. Химическая гипотеза Слэйтера оставлена.

Широкое признание получила *хемиосмотическая теория Митчелла* (1961). Она исходит из трех постулатов.

Во-первых, фосфорилирование происходит только в мембранах, содержащих замкнутые везикулы. Мембрана отделяет внутреннее пространство везикула от внешнего. Она имеет низкую проницаемость для протонов.

Во-вторых, предполагается, что перенос электронов между компонентами ЦПЭ сопровождается переносом протонов сквозь мембрану. Переносчики расположены асимметрично относительно обеих сторон мембраны. Первичным макроэргом является протонодвижущая сила:

$$\Delta\tilde{\mu}_H = \tilde{\mu}_H^{\text{вход}} - \tilde{\mu}_H^{\text{выход}} =$$

$$= RT \ln [H^+]^{\text{вход}}/[H^+]^{\text{выход}} + \mathcal{F}\Delta\psi = -2{,}3RT\Delta pH + \mathcal{F}\Delta\psi. \quad (13.2)$$

В-третьих, предполагается, что $\Delta\tilde{\mu}_H$ определяет синтез АТФ с помощью фермента, связанного с мембраной,— АТФ-*синтетазы*. Фермент действует векторно, образует канал, по которому перемещаются протоны. Синтез одной молекулы АТФ требует прохождения многих протонов.

Фермент работает обратимо. При гидролизе АТФ протоны переносятся назад и мембрана энергизуется.

Прежде чем рассмотреть теорию Митчелла, остановимся на общем термодинамическом описании сопряжения.

При сопряжении двух процессов — окисления (о) и фосфорилирования (ф) — имеем (ср. с. 310)

$$J_o = L_{11}\frac{\mathcal{A}_o}{T} + L_{12}\frac{\mathcal{A}_ф}{T},$$
$$J_ф = L_{12}\frac{\mathcal{A}_o}{T} + L_{22}\frac{\mathcal{A}_ф}{T}. \quad (13.3)$$

Находим

$$J_ф/J_о = (q + lx)/(l^{-1} + qx), \qquad (13.4)$$

где q — степень сопряжения

$$q = L_{12}/\sqrt{L_{11}L_{22}}, \qquad (13.5)$$

$l = (L_{22}/L_{11})^{1/2}$, а x — отношение значений сродства:

$$x = \mathcal{A}_ф/\mathcal{A}_о. \qquad (13.6)$$

При полном сопряжении $q = 1$ и $J_ф/J_о = l$, независимо от x. Как мы видели, Ф/О $= J_ф/J_о$, т. е. число молекул АТФ, синтезируемых при расходовании одного атома кислорода, равно трем. Следовательно, $l = 3$. В отсутствие сопряжения $q = 0$ и $J_ф/J_о = l^2x = 9\,\mathcal{A}_ф/\mathcal{A}_о$. При неполном сопряжении $0 < q < 1$ и отношение Ф/О нелинейно зависит от x. Опыт дает значение q, близкое к 1.

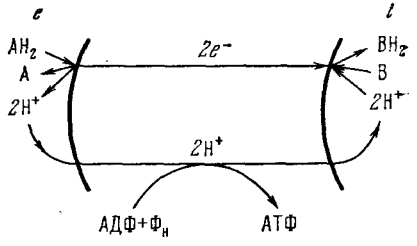


Рис. 13.7. Схема хемиосмотического сопряжения по Митчеллу: i — внутренняя, e — внешняя стороны мембраны

Учитывая перенос протонов, нужно рассматривать три потока — еще и поток H^+. Функция диссипации имеет вид

$$\sigma = T^{-1}(J_ф\mathcal{A}_ф + J_о\mathcal{A}_о + J_н\Delta\tilde{\mu}_н), \qquad (13.7)$$

где $\Delta\tilde{\mu}_н$ дается формулой (13.2). Химические реакции окисления и фосфорилирования сопряжены с векторным потоком протонов — коэффициенты $L_{оН}$ и $L_{фН}$ отличны от нуля.

Схема хемиосмотического сопряжения Митчелла показана на рис. 13.7. Сопрягающей системой является мембрана. Донор водорода AH_2 (например, аскорбат) окисляется переносчиком электронов (например, цитохромом c) у внешней стороны мембраны. Два электрона переносятся через мембрану по дыхательной цепи и посредством цитохромоксидазы передаются акцептору водорода В, т. е. кислороду. Акцептор присоединяет два протона из внутренней фазы митохондриального матрикса. Создается градиент концентраций протонов — их избыток во внешней и недостаток во внутренней жидкой фазе. Вследствие этого происходит перенос протонов через мембрану в противоположном направлении, в результате чего и реализуется фосфорилирование. Синтез одной молекулы АТФ приводит к поглощению двух протонов из внешней фазы и выделению двух протонов в матрикс. Митохондриальная мембрана работает как *топливный элемент*, в котором разность электрохимических потенциалов создается за счет окислительно-восстановительного процесса.

Теория Митчелла исходит из рассмотрения равновесных соотношений. Разность свободных энергий в системе слагается из химической и осмотической (транспортной) работы:

$$\Delta G = \Delta G_{\text{хим}} + \Delta G_{\text{осм}}, \tag{13.8}$$

где

$$\Delta G_{\text{осм}} = \sum_j \nu_j (\tilde{\mu}_j - \mu_j^0) + \sum_i \nu_i (\tilde{\mu}_i - \mu_i^0). \tag{13.9}$$

Сумма по j есть сумма по всем продуктам, по i — по всем реагентам; μ_j^0, μ_i^0 — стандартные химические потенциалы, ν_j, ν_i —

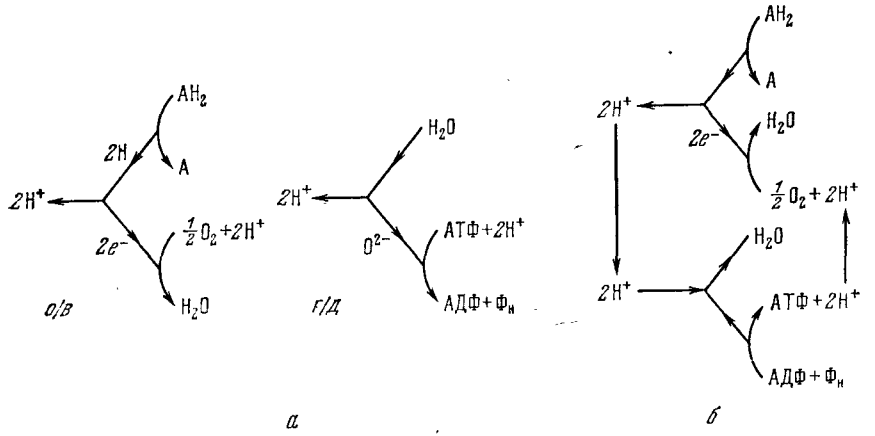


Рис. 13.8. Детализация схемы Митчелла: *а* — петли *о/в* и *г/д*; *б* — сопряжение обоих процессов

стехиометрические коэффициенты. Если переносится лишь один компонент, то обобщенная сила, действующая на него, есть

$$\Delta\tilde{\mu} = -\Delta G_{\text{осм}}/\nu. \tag{13.10}$$

Схему, показанную на рис. 13.3, можно считать состоящей из двух петель (рис. 13.8, *а*) — окислительно-восстановительной (дыхание, *о/в*-петля) и гидрогенизационно-дегидрогенизационной (дефосфорилирование, *г/д*-петля). Сопряжение обоих процессов посредством протонного транспорта показано на рис. 13.8, *б*. Согласно (13.10) имеем в равновесии

$$\Delta\tilde{\mu}_{\text{н}} = -\Delta G_{\text{осм}}/2 = \mathcal{F}\Delta\psi. \tag{13.11}$$

В процессах о/в и г/д

$$-(\Delta G_{\text{осм}})_{\text{о/в}} = -(\Delta G_{\text{осм}})_{\text{г/д}} = 2\Delta\tilde{\mu}_{\text{н}}. \tag{13.12}$$

Полный электрохимический потенциал каждого компонента равен

$$\tilde{\mu}_i = pV_i + z_i\mathcal{F}\psi + \mu_i^0 + RT\ln c_i, \tag{13.13}$$

где p — давление, V_i — молярный объем, z_i — заряд компонента, c_i — концентрация (активность). Так как член $V_i\Delta p$ относительно мал, полная обобщенная сила, приводящая к равновесию i-го компонента во внешней фазе и в матриксе, равна

$$\Delta\tilde{\mu}_i \approx z_i\mathcal{F}\Delta\psi + RT\Delta \ln c_i. \qquad (13.14)$$

Для протонов, переходя к pH, получаем формулу (13.2):

$$\Delta\tilde{\mu}_H = -2{,}3RT\Delta pH + \mathcal{F}\Delta\psi.$$

В равновесии $\Delta\tilde{\mu}_H = 0$, и из (13.14) следует

$$\Delta\psi \equiv \varphi = \frac{RT}{z_i\mathcal{F}} \ln \frac{c_i^{(e)}}{c_i^{(i)}}, \qquad (13.15)$$

т. е. уже известная нам формула Нернста — Доннана (с. 344).

При сопряжении синтеза АТФ с переносом двух зарядов электрона (это следует из экспериментально найденного отношения $\Phi_н/2e^- = 1$ для каждого центра фосфорилирования), необходимое значение не менее 200 мВ. При толщине мембраны

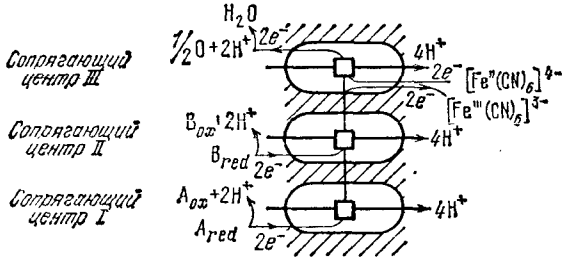


Рис. 13.9. Выделение протонов и разделение зарядов в трех центрах сопряжения. Квадраты указывают неизвестные механизмы сопряжения переноса e^- и H^+

порядка 10 нм напряженность электрического поля в ней должна быть не менее $2 \cdot 10^5$ В/см. Значение $\varphi = 200$ мВ эквивалентно вкладу $\Delta pH = 3{,}5$ в общую протонодвижущую силу.

Митчелл рассмотрел также сопряжение потоков протонов и катионов, движущихся в противоположных направлениях («антипорт»), протонов и анионов, движущихся в одном направлении («симпорт»).

В недавних работах были проведены тщательные определения числа протонов, числа зарядов и числа молекул АТФ, приходящихся на каждый из трех центров сопряжения в ЦПЭ (ср. с. 427). С помощью различных доноров и акцепторов электронов были получены результаты, схематически показанные на рис. 13.9. Каждый центр сопряжения имеет *протонный насос*, разделяющий 4 заряда (4 протона выходят из цитоплазмы в матрикс) — отношение H^+/центр = 4 во всех трех центрах. При про-

хождении двух электронов (e^-) через центр I отделяются два заряда и синтезируется одна молекула АТФ, в центре II на $2e^-$ выделяется половина молекулы АТФ и отделяются два заряда, в центре III на $2e^-$ выделяются 1,5 молекулы АТФ и отделяются 6 зарядов.

При сопряжении синтеза АТФ с переносом $2e^-$ необходимое значение φ не менее 200 мВ. При толщине мембраны порядка 10 нм напряженность электрического поля в ней должна быть не менее $2 \cdot 10^5$ В/см. Значение $\varphi = 200$ мВ эквивалентно вкладу $\Delta pH = 3{,}5$ в общую протонодвижущую силу.

Теория Митчелла получила ряд качественных подтверждений. Либерман и его сотрудники изучили транспорт ионов через искусственные фосфолипидные мембраны. В присутствии синтетических ионов, с зарядом, экранированным гидрофобными заместителями, например тетрабутиламмония $N^+[(CH_2)_3CH_3]_4$ или тетрафенилбората $B^-(C_6H_5)_4$, существенно повышается электропроводность системы. Эти ионы быстро диффундируют сквозь мембраны. Был изучен транспорт этих ионов через митохондриальные мембраны (ММ) и субмитохондриальные частицы (СМЧ), полученные путем обработки митохондрий ультразвуком. ММ и СМЧ оказываются ориентированными противоположным образом. Цитохром *c* локализован на внешней стороне ММ и на внутренней стороне мембраны СМЧ. Можно думать, что внутримитохондриальное пространство заряжено отрицательно, а внутреннее пространство СМЧ — положительно. Энергизация СМЧ добавкой АТФ вызывает поглощение синтетических анионов, а деэнергизация ингибитором дыхания (актиномицином) или разобщителем окислительного фосфорилирования (производное фенилгидразона) вызывает выход анионов. Транспорт электронов в мембранах СМЧ сопровождается поглощением синтетических анионов. В свою очередь их транспорт нарушается ингибиторами электронного транспорта и разобщителями окислительного фосфорилирования.

В целом эксперимент показывает, что в сопрягающих мембранах происходит энергозависимый транспорт ионов. Его механизм не зависит от структуры ионов, способных проникать через фосфолипидные мембраны. Изменение ориентации мембран относительно окружающей среды (ММ и СМЧ) приводит к переориентации ионных потоков, направленных против градиентов концентрации ионов.

Согласно теории Митчелла, перенос протонов и электронов сквозь мембрану не приводит к большим изменениям pH. Транспорт электронов, т. е. окислительный процесс, прекращается под действием электрического поля, создаваемого избытком отрицательных зарядов на другой стороне мембраны. Перенос электронов активируется вновь при уменьшении этого поля, т. е. мембранного потенциала. Этого можно достичь перемещением катионов через мембрану. В результате должен возникнуть градиент pH, так как перенос каждого одновалентного катиона должен со-

провождаться освобождением одного протона во внешней среде. Добавление проникающих синтетических катионов к митохондриям вызывает увеличение концентрации H^+ в среде. Изменения pH исчезают при добавлении разобщителей. При работе дыхательной цепи среда подкисляется. Таким образом, установлено, что энергизация сопрягающей мембраны создает трансмембранный потенциал $\Delta\psi$ и разность ΔpH.

Из хемиосмотической теории следует, что энергия дыхания, трансформированная из химической формы в электрическую и осмотическую, может быть вновь переведена в химическую форму при синтезе АТФ или обратном переносе электронов. Биоэнергетический процесс обратим, что подтверждается опытом. Реализуется ионное фосфорилирование за счет электрической или осмотической энергии, выделяемой при движении ионов через мембрану по концентрационному градиенту.

Снижение $\Delta\psi$ должно приводить к нарушению сопряжения окисления и фосфорилирования. К этому сводится действие разобщителей сопряжения. Таковыми являются динитрофенол (ДНФ) и другие вещества. ДНФ, по-видимому, действует как переносчик протонов. Если схема Митчелла верна, то любые слабые кислоты и основания должны оказывать разобщающее действие. Разобщители действительно повышают протонную проводимость ММ. Выявлено далеко идущее сходство искусственных фосфолипидных мембран с внутренними мембранами митохондрий.

В работах лабораторий Либермана и Скулачева расположение дыхательной цепи определялось по ее способности образовывать мембранный потенциал. В среду вводились различные доноры и акцепторы электронов, не проникающие сквозь мембрану. Оказалось, что эти вещества взаимодействуют лишь с цитохромом *c* в митохондриях. Установлено, что транспорт протонов и (или) электронов по дыхательной цепи действительно происходит. В других экспериментах определена локализация компонентов в мембране митохондрий. На рис. 13.10 показано вероятное расположение цепи. Согласно хемиосмотической гипотезе, любая сопрягающая система должна создавать электрохимический потенциал ионов H^+. Действительно, опыты с проникающими синтетическими ионами показали возникновение $\Delta\psi$ в митохондриях, СМЧ, хлоропластах (см. гл. 14) и мембранах бактерий. В то же время теория Митчелла встречается с трудностями и вызывает возражения. Блюменфельд приводит аргументы, показывающие невозможность построения «машины Митчелла» в конденсированной фазе. В такой машине АТФ-синтетаза использует разность концентраций протонов в водной фазе по обе стороны мембраны для выполнения внешней работы. Это — энтропийная машина, получающая энергию из термостата в форме кинетической энергии протонов. Протоны движутся преимущественно по градиенту концентраций и передают свои импульсы подвижным частям машины; разность потенциалов $\Delta\psi$ расходуется на создание

«горячих» протонов с высокой энергией. Соответствующее отклонение от равновесия по Больцману маловероятно, так как релаксация возбужденных термических степеней свободы происходит быстро — за 10^{-11}—10^{-12} с. Следовательно, АТФ-синтетаза должна быть энтропийной машиной другого типа: энергия, полученная из термостата при взаимодействии протона с синтетазой,

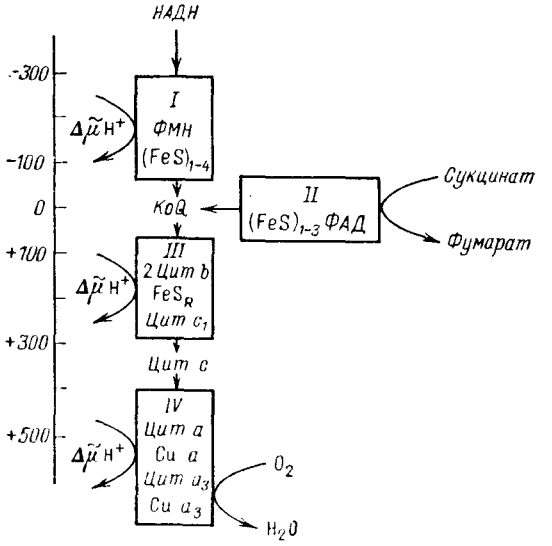


Рис. 13.10. Энергетическая схема электронного транспорта в митохондриях: *ФМН* — флавинмононуклеотид, $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ — трансмембранная разность электрохимических потенциалов протонов

превращается в локальное повышение потенциальной энергии. Внешняя работа может быть произведена, лишь если в элементарном акте на обеих сторонах мембраны возникает разность потенциалов $\Delta\varphi$. АТФ-синтетаза, взаимодействующая с протонами, должна работать как водородный электрод и вся система использования разности концентраций протонов ΔpH как концентрационный гальванический элемент. Единственный способ использовать оба компонента $\Delta\tilde{\mu}_H$ — создание общего электрического поля, и протоны, движущиеся внутри АТФ-синтетазы, должны накапливаться в аккумуляторе неизвестной природы, пока не наберется энергия, достаточная для синтеза одной молекулы АТФ. Нельзя, однако, использовать ΔpH для сдвига химического равновесия — вся свободная энергия неравновесного состояния пошла на образование поля.

Остается также неясным, как электронно-донорный процесс (перенос протонов по градиенту μ_H) может обеспечить накопление энергии (в АТФ) без ее диссипации.

В недавних работах Блюменфельда (см. с. 440) показано, что образование АТФ в мембранах непосредственно связано с конформационной релаксацией, а не с разностью химических потенциалов протонов.

Независимо от этих исследований значение хемиосмотической теории велико. Она послужила мощным стимулом для глубокого изучения биоэнергетики сопрягающих мембран и предложила объяснение ряда фактов, относящихся к биоэнергетике и фотобиологии (см. § 14.3, 14.4, 14.8).

§ 13.4. Электронно-конформационные взаимодействия

Перемещение электронов в молекулярных системах всегда сопровождается перемещением атомных ядер. Как мы видели (гл. 6), в биополимерных системах реализуются электронно-конформационные взаимодействия (ЭКВ). Движение электрона и плотности зарядов в биополимерной системе, в частности, в мембране, сопряженное с конформационными движениями, может трактоваться как перемещение квазичастицы — *конформона* (с. 198). Есть весьма веские основания рассматривать окислительное фосфорилирование в ЦПЭ, исходя из этих представлений.

Грин и Джи (1972) предложили электромеханохимическую модель структуры и функции митохондрий. Элементарные частицы митохондрий (ЭЧМ) предполагаются существующими в основном неэнергизованном и в возбужденном энергизованном состояниях. Свободная энергия данного состояния слагается из химической, электрической и механической энергий. Взаимное превращение этих вкладов определяется ЭКВ. Конкретная модель Грина и Джи имеет, однако, гипотетический характер.

В работах Блюменфельда и сотрудников были установлены конформационные превращения в мембранах митохондрий (с помощью спектров ЭПР спин-меченых мембран, с помощью спектров люминесценции и т. д.). Доказана высокая кооперативность этих превращений и наличие термических структурных переходов в СМЧ.

Блюменфельд (1972) выдвинул гипотезу *релаксационных конформационных переходов* в митохондриальных мембранах. Допустим, что элементарный акт состоит в присоединении электрона к активному центру (скажем, к группе гема цитохрома). Нейтральной форме макромолекулы соответствует равновесная конформация I, заряженной (восстановленной) — другая конформация — II. Перенос электрона происходит много быстрее конформационного изменения. Следовательно, при протекании элементарного акта образуется неравновесное конформационное состояние — электрон перешел, но конформация не успела измениться. Затем происходит медленная релаксация к состоянию II. Весь переход можно представить схемой (минус обозначает электрон):

$$\mathrm{I} \xrightarrow[\text{быстро}]{} \mathrm{I}^- \xrightarrow[\text{медленно}]{} \mathrm{II}^- \xrightarrow[\text{быстро}]{} \mathrm{II} \xrightarrow[\text{медленно}]{} \mathrm{I}.$$

Энергия, выделяемая в элементарном акте, запасается в форме конформационной энергии в течение времени релаксации. За

время релаксации конформационная энергия трансформируется в химическую, т. е. электронную.

Эта картина полностью согласуется с концепциями электронно-конформационных взаимодействий (ЭКВ) и конформона. Применительно к ЦПЭ можно предположить, что в пункте сопряжения создается лабильный комплекс между переносчиком и некоторой группой в активном центре фермента сопряжения, роль которой, вероятно, играет аденин связанного АДФ. При релаксации $I^- \rightarrow II^-$ в какой-то момент энергетический уровень, на котором находится электрон, понижается до акцепторного уровня аденина. Эти два уровня разделены барьером, но возможен подбарьерный *туннельный переход* электрона на аденин. Увеличение электронной плотности на аденине сопровождается резким повышением основности аминогруппы. Если в активном центре АТФ-синтетазы имеется электрофильная группа (например, карбоксил), то аденин реагирует с нею, образуя амидную связь. В следующий момент релаксации уровень переносчика опускается ниже уровня аденина и электронная плотность переходит с аденина обратно на редокс-группу того же или следующего переносчика электрона в ЦПЭ.

Блюменфельд и Чернавский (1973) обобщили эту модель применительно к любым ферментативным реакциям. Формулируется постулат, согласно которому конформационное изменение субстратферментного комплекса, следующее за присоединением субстрата к активному центру фермента, включает в себя кроме разрыва старых и образования новых вторичных связей в макромолекуле белка также химические изменения субстрата. Элементарный акт ферментативной реакции заключается в конформационном изменении макромолекулы (фермент-субстратного комплекса, ФСК), и скорость превращения субстрат — продукт определяется скоростью этого конформационного изменения. Можно представить каталитический разрыв связи А — В субстрата последовательностью четырех стадий:

$$A - B + E \xrightarrow{1} (A - B)\,E \xrightarrow{2} A\tilde{E}B \xrightarrow{3} \tilde{E} + A + B \xrightarrow{4} E + A + B.$$

Здесь 1 — быстрая стадия образования ФСК, 2 — медленная релаксация фермента Е в новую конформацию $\tilde{E}$, 3 — быстрый отрыв продукта, 4 — медленный переход $\tilde{E} \rightarrow E$. На всех стадиях происходит изменение свободной энергии.

На основе теории релаксационных конформационных переходов Блюменфельд в последние годы провел экспериментальные исследования синтеза АТФ в биологических мембранах — как в митохондриях, так и в тилакоидах (см. гл. 14). Показано, что АТФ синтезируется из АДФ и фосфата при скачкообразном повышении pH среды от 5 до 9. Это можно трактовать не как результат создания трансмембранного градиента pH, а как следствие возникновения неравновесных состояний АТФ-азы и других белков в цепях электронного транспорта и/или целой тилакоидной мембраны благодаря диссоциации определенных кислот-

ных групп. Хемиосмотическая теория приводит к синтезу АТФ при понижении pH. В ходе релаксации неравновесного состояния фермента реализуется энергоакцепторная стадия синтеза АТФ (например освобождение связанного АТФ, образовавшегося без затраты энергии из АДФ и $Ф_н$). Не успевшая релаксировать молекула фермента служит первичным макроэргом. Число молекул АТФ, образующихся за счет скачка pH, составляет 2—5 за один скачок на одну цепь электронного транспорта. Для митохондрий время релаксации $\tau_{1/2}$, т. е. время, в течение которого выход АТФ снижается вдвое, составляет при комнатной температуре 10 с, т. е. релаксация достаточно медленна. Синтез АТФ в результате скачка pH дополнителен к таковому при нормальном окислительном фосфорилировании.

Таким образом, релаксационная теория, неотделимая, очевидно, от теории ЭКВ, получила весьма существенные экспериментальные подтверждения.

Для построения кинетической теории нужно определить относительную роль двух механизмов — надбарьерного перехода по Эйрингу (см. § 6.1) и *туннельного эффекта*. Второй эффект при переносе электрона в биологической системе был впервые рассмотрен Чансом (1968).

Константа скорости активационного перехода равна (с. 175)

$$k_1 = \frac{\kappa T}{h} \exp\left(-\frac{G^+}{\kappa T}\right). \qquad (13.16)$$

Число актов туннельного перехода в единицу времени равно

$$k_2 = \nu_0 \exp\left[-\frac{4\pi L}{h}\sqrt{2m_e(U-E)}\right], \qquad (13.17)$$

где ν_0 — частота «колебаний» электрона, величина порядка 10^{17} $с^{-1}$, L — ширина барьера, U — его высота, E — уровень энергии электрона, m_e — его

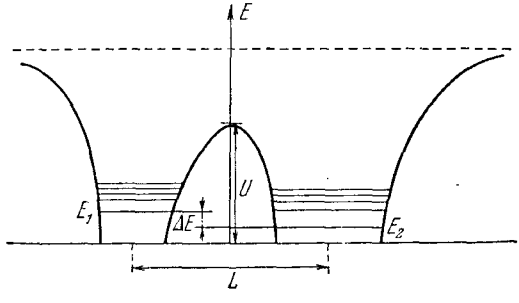


Рис. 13.11. Две несимметричные потенциальные ямы, разделенные барьером

масса. На рис. 13.11 показана схема потенциальных ям двух соседних звеньев ЦПЭ.

Полная скорость переноса определяется суммой k_1 и k_2. При высоких температурах преобладает первый член, при низких — второй. Согласно имеющимся оценкам $L \approx 1$—2 нм, $U \approx G^+ \approx 1$—2 эВ. При этих значениях

$k_2 \gg k_1$. Отсюда следует, что переходы должны быть практически не зависимы от температуры, что противоречит опыту. Это противоречие можно объяснить.

Туннелирование электрона зависит от соотношения между разностью электронных уровней ΔE (см. рис. 13.11) и величиной резонансного расщепления:

$$\Delta E_r = E \exp\left[-\frac{2\pi L}{h}\sqrt{2m_e(U-E)}\right]. \qquad (13.18)$$

Если $\Delta E \gg \Delta E_r$, то туннельного перехода не будет. При $\Delta E \leqslant \Delta E_r$ переход происходит за время $\tau_r = \hbar\,(\Delta E_r)^{-1}$. При $L = 2$ нм, $U - E = 2$ эВ $\Delta E_r \approx$ $\approx 10^{-6}$ эВ. Значения ΔE в ЦПЭ должны быть много больше, и такой идеальный переход невозможен. Туннелирование, однако, происходит вследствие диссипации энергии, обеспечивающей сближение электронных уровней и определяемой ЭКВ. Чернавская и Чернавский рассматривают потенциальные ямы, защищенные от ионной среды неполярной оболочкой. Допустим, что существенна лишь одна колебательная степень свободы. Возможно возбуждение колебательного кванта $E_к$, причем

$$\Delta E = \hbar\omega_к \equiv E_к, \qquad (13.19)$$

или увеличение энергии уже имеющегося кванта

$$\Delta E = \Delta E_к \equiv \hbar\,\Delta\omega_к. \qquad (13.20)$$

Значения $E_к$ и $\Delta E_к$ порядка 0,1 эВ. Вероятность туннельного перехода при условии (13.19) выражается формулой

$$w = \frac{2E^2}{\hbar}\rho(\Delta E)\,g^2 \exp\left[-\frac{4\pi L}{h}\sqrt{2m_e(U-E)}\right]. \qquad (13.21)$$

Здесь $\rho(\Delta E)$ — плотность уровней конечного состояния, $g^2 = 10^{-2}$—10^{-4} — константа, характеризующая «силу связи». В случае (13.20)

$$w = \frac{E^2}{\pi\hbar}\rho(\Delta E - \Delta E_к)\exp\left(-\frac{\hbar\omega_к}{\kappa T}\right)\exp\left[-\frac{2L}{\hbar}\sqrt{2m_e(U-E)}\right]. \qquad (13.22)$$

Величина w зависит от температуры.

В следующем параграфе кратко обсуждается кинетика окисления — восстановления цитохрома *с*.

В биополимерных системах возникает конформон (с. 198). Далее приводится грубая оценка его энергии и размеров.

В среде, содержащей равномерно распределенные ионы массы M, взаимодействующие по закону Кулона, имеем (согласно теореме вириала)

$$^1/_2 M v^2 \approx e^2/r. \qquad (13.23)$$

Скорости v и расстоянию r соответствует круговая частота колебаний

$$\omega_к = \frac{v}{r} = \sqrt{\frac{8\pi}{3}\frac{e^2}{M}n}, \qquad (13.24)$$

где $n = \left(\frac{4\pi}{3}r^3\right)^{-1}$ — число ионов в единице объема. Взаимодействуя с колебаниями (конформационными переходами) ионов, электрон приобретает энергию $\hbar\,\omega_к$ и импульс

$$p = \sqrt{2m_e\hbar\omega_к} \equiv \sqrt[4]{4m_e^2\hbar^2\omega_к^2},$$

где m_e — масса электрона. Согласно соотношению неопределенностей соот-

ветствующий размер электронного облака равен

$$q = \frac{\hbar}{p} = \sqrt{\frac{\hbar}{2m_e\omega_к}} = \sqrt[4]{\frac{3}{32\pi}}\sqrt[4]{\frac{\hbar^2 M}{m_e^2 e^2 n}}.$$

Вводя боровский радиус $a_0 = \hbar/m_e e^2 \approx 0{,}05$ нм, получаем

$$q = \sqrt[4]{\frac{3}{32\pi}}\sqrt[4]{\frac{Ma_0}{m_e n}} = a_0\sqrt[4]{\frac{3}{32\pi}}\sqrt[4]{\frac{M}{m_e n a_0^3}}. \qquad (13.25)$$

Размеры конформона должны быть того же порядка. Энергия поляризации по порядку величины равна

$$E_p = e^2/(\varepsilon q), \qquad (13.26)$$

где ε — микроскопическая диэлектрическая проницаемость. Наконец, отношение E_p к энергии колебаний дает число квантов, участвующих в образовании конформона:

$$N = E_p/(\hbar\omega_к). \qquad (13.27)$$

Для белков среднее значение плотности зарядов $n \approx 10^{21}$ см$^{-3}$, т. е. расстояние между зарядами порядка 1 нм. Если заряды расположены на протонах, то $M = (6{,}2\cdot 10^{23})^{-1}$ г. Величину ε можно считать равной 3. Получаем $\omega_к \approx \approx 2\pi\cdot 0{,}6\cdot 10^{13}$ с$^{-1}$, размеры конформона $q \approx 1{,}5$ нм, т. е. поляризацией охвачена практически вся молекула. Энергия поляризации $E_p \approx 0{,}35$ эВ, сдвиг уровней электрона того же порядка. Наконец, $N \approx 15$.

В кинетике электронно-конформационных переходов можно выделить четыре процесса: 1) колебания электрона внутри ямы с частотами порядка 10^{17} с$^{-1}$; 2) колебания атомов с частотами порядка $\kappa T/h \sim 10^{13}$ с$^{-1}$ и с амплитудами 10^{-2}—10^{-3} нм; частоты упругих колебаний белковой глобулы порядка 10^{12}—10^{11} с$^{-1}$; 3) туннелирование электрона, $\tau \sim 10^{-7}$—10^{-6} с, расстояния 1—2 нм; 4) медленные конформационные переходы в макромолекуле, $\tau > 10^{-3}$ с.

Таким образом, можно не рассматривать быстрые процессы 1)—3) и усреднять по времени положения электронов и атомов. Именно такая процедура применена в описанной выше релаксационной модели. Молекула, получив электрон, оказывается в неравновесной конформации, медленно релаксирующей к равновесию. Для туннельного эффекта требуется поэтому не совпадение электронных уровней восстановленных донора и акцептора, но наличие надлежащим образом расположенного виртуального электронного уровня акцептора в окислительной конформации. Энергия, выделившаяся при туннелировании, диссипирует, но энергия, медленно выделяемая при конформационной релаксации, может быть конвертирована в энергию макроэрга. Будучи связан с условиями резонанса электронных уровней энергии, туннельный эффект подвержен влиянию мембранного потенциала. Следовательно, возможен регуляторный процесс — мембранный потенциал, создаваемый активным транспортом ионов, зависит от скорости переноса электронов, в свою очередь регулируемой мембранным потенциалом. Реализуется обратная связь,

обеспечивающая автоматическое поддержание системы в условиях, близких к резонансным.

Конформационные события несомненно играют важную роль в сопрягающих мембранах. Следует думать, что наряду с электронно-конформационными реализуются и протонно-конформационные взаимодействия. Протоны также могут туннелировать — в отличие от более тяжелых атомов и групп.

§ 13.5. Цитохром *c*

Среди электронных переносчиков лучше всего изучен цитохром *c* — универсальный гемсодержащий белок, обязательный участник процессов дыхания любых организмов, начиная с дрожжевых клеток и кончая человеком.

Установлены первичные структуры цитохрома *c* многих десятков организмов. Цитохромы *c* позвоночных содержат 104 аминокислотных остатка, насекомых — 107, низших растений — 107—109, высших — 111. Последовательность остатков хорошо отражает биологическую эволюцию (с. 35, см. также § 17.9). Эволюционные изменения цитохрома *c* во всей живой природе сводятся, как правило, к замещениям остатков внутри одного класса (гидрофобные ароматические, гидрофобные алифатические, гидрофильные основные, гидрофильные кислотные, амбивалентные). Это указывает на далеко идущее сходство пространственной структуры всех цитохромов *c*.

Цитохромы *c* — древние белки. В ходе эволюции клетки перешли от анаэробных процессов к дыханию. Именно на этой стадии, примерно $1{,}2 \cdot 10^9$ лет назад, возникли цитохромы *c*.

Стабильность пространственной структуры цитохрома *c*, выработанная в ходе эволюции, доказывается, в частности, тем, что цитохромы *c*, выделенные из любого эукариота, реагируют *in vitro* с цитохромоксидазой любого другого вида. Структура цитохрома *c* показана на рис. 13.12. Группа гема соединена пятой и шестой валентностями атома железа с имидазольным кольцом Гис 18 и атомом серы Мет 80. Гем связан ковалентно также с Цис 14 и Цис 17. Ближайшее окружение гема — последовательность остатков 70—80 — инвариантно. Эти остатки одинаковы почти у всех видов: -Асн-Про-Лиз-Лиз-Тир-Иле-Про-Гли-Тре-Лиз-Мет-.

Естественно думать, что конформация цитохрома *c* изменяется при переходах $Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+}$. Первоначальные результаты рентгеноструктурного анализа (Дикерсон, Уинфилд) показывали, что при восстановлении цитохрома *c* изменяется положение нескольких ароматических остатков. Эта прямая демонстрация ЭКВ выглядела очень привлекательно. К сожалению, эти результаты не подтвердились. Лишь недавно обнаружены малые различия в пространственном строении окисленного и восстановленного цитохрома *c*, сводящиеся к изменению положения молекулы воды, примыкающей к гему.

Квантовомеханическая теория окислительно-восстановительных превращений цитохрома развита в ряде работ, в частности, в работах Джортнера (1976) и Догонадзе и его сотрудников (1977 и ранее). Джортнер рассмотрел зависимость от температуры энергии активации для переноса электронов между биологическими молекулами. Теория непосредственно учитывает ЭКВ — исследуются многофононные переходы, соответствующие

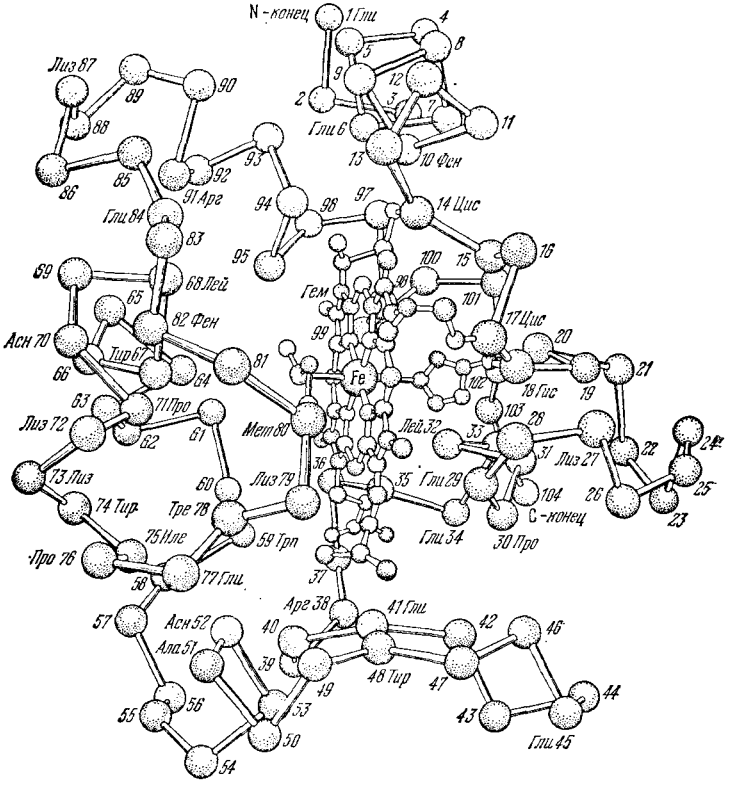


Рис. 13.12. Структура цитохрома *c*

конформационным движениям. В согласии с опытом, Джортнер получает при низких температурах безактивационный переход электрона и возникновение сильной температурной зависимости для перехода в узкой области вблизи $k\mathrm{T}/\hbar\langle\omega\rangle \approx 0{,}1-0{,}2$, где $\langle\omega\rangle$ — средняя частота колебаний ядер. Температурная зависимость скорости перехода электрона начинается, таким образом, при температуре, гораздо более низкой, чем характеристическая колебательная температура.

В работе Догонадзе, Кузнецова и Ульструпа (1977) дана строгая теория конформационной динамики процессов переноса электронов и атомов в биологических реакциях. Практические

расчеты на основе этой теории, однако, трудны — волновые функции систем неизвестны. Большее значение для биофизики имеют качественные грубые модели (с. 193 и 194) и качественные методы квантовой химии (с. 199).

Очевидна большая актуальность исследований окислительно-восстановительных биологических процессов. Многие методы здесь информативны. В частности, магнитная спектрополяриметрия (§ 5.8) позволяет непосредственно следить за превращениями различных типов цитохромов в ЦПЭ во взвеси субмитохондриальных частиц. Те же методы позволили наблюдать возбужденные конформации окислительно-восстановительных гемсодержащих ферментов (Шаронов, ср. с. 163).

Глава 14

ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

§ 14.1. Фотосинтез

Биоэнергетические процессы, описанные в предыдущих главах и сводящиеся к запасанию химической энергии АТФ и ее расходованию, являются темновыми, они происходят без участия света. *В этой главе мы рассмотрим важнейшие фотобиологические процессы.*

Фотосинтез в зеленых растениях определяет существование всех высших форм жизни, так как кислород в атмосфере Земли образован именно в результате фотосинтеза (см. § 17.1). Суммарное уравнение фотосинтеза имеет вид

$$CO_2 + H_2O + \hbar\omega \rightarrow (CH_2O) + O_2 + 470 \text{ кДж/моль}.$$

Здесь $\hbar\omega$ — квант света, (CH_2O) — фрагмент молекулы углевода. При фотореакции выделяется энергия 470 кДж/моль. Изменение свободной энергии составляет 504 кДж/моль, следовательно, изменение энтропии равно — 113 Дж/(моль · К) (при 300 К). На образование одной молекулы O_2 расходуется 8 квантов света (см. с. 448) с суммарной энергией около 1470 кДж/моль. Тем самым коэффициент использования солнечной энергии равен $500/1470 = 0{,}34$. Выделение ~470 кДж/моль энергии следует из баланса:

Энергия двух связей C = O в CO_2	$798 \times 2 =$	1596
Энергия двух связей O — H в H_2O	$462 \times 2 =$	924
Итого		2520
Энергия связи O = O в O_2		487
Энергия двух связей C — H в формальдегиде CH_2O	$386 \times 2 =$	772
Энергия связи C = O в CH_2O		798
Итого		2057

$$2520 - 2057 = 463 \text{ кДж/моль}.$$

Эта же величина следует из окислительно-восстановительного потенциала пары $^1/_2O_2/H_2O$, равного +0,81 эВ, и пары $CO_2/CH_2O + H_2O$, равного —0,40 эВ. Итого 1,21 эВ. В фотосинтезе для восстановления CO_2 до углевода нужно перенести 4 атома водорода с H_2O на CO_2:

$$CO_2 + 2H_2O \rightarrow (CH_4O_2) + O_2 \rightarrow (CH_2O) + H_2O + O_2.$$

Баланс энергии: $1{,}21 \cdot 4 = 4{,}84$ эВ $\equiv$ 470 кДж/моль.

Таким образом, фотосинтез в зеленых растениях означает реакцию между окислителем CO_2 и восстановителем H_2O, в которой 4 электрона (или 4 атома H) переносятся «вверх», преодолевая разность потенциалов около 1,2 В, что показано схематически на рис. 14.1. При бактериальном фотосинтезе вместо воды

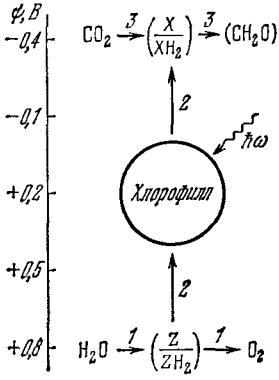


Рис. 14.1. Схема фотосинтеза: *1* — ферментативное превращение H_2O в O_2, *2* — перенос водорода от промежуточного вещества Z/ZH_2 к X/XH_2 в последовательности ферментативных стадий с помощью активированного светом хлорофилла, *3* — ферментативное превращение CO_2 в (CH_2O)

может фигурировать H_2S; при этом редокс-потенциал H_2S/S составляет лишь 0,2 В. Энергия, необходимая для реакции, подается светом. Первая стадия процесса состоит в поглощении света пигментами, среди которых наиболее важен *хлорофилл*. Тимирязев показал, что спектр действия солнечного света при фотосинтезе соответствует спектру поглощения хлорофилла. На рис. 14.2 приведены структурные формулы важнейших пигментов растений; на рис. 14.3 показаны полосы поглощения пигментов.

Фотосинтез можно определить как процесс фотоиндуцированного электронного транспорта, конечным результатом которого является усвоение CO_2. Скорость фотосинтеза зависит от интенсивности падающего света I. Грубо говоря, скорость образования некоего субстрата пропорциональна числу поглощенных квантов. Этот неустойчивый субстрат преобразуется далее в ферментативных процессах. Опыт показывает, что для продукции одной молекулы O_2 нужно $n \approx 8$ молекул субстрата. На один ферментативный комплекс или на одну молекулу обобщенного фермента (*фотосинтетическая единица*) приходится около 300 молекул хлорофилла (50 в фотосинтезирующих бактериях).

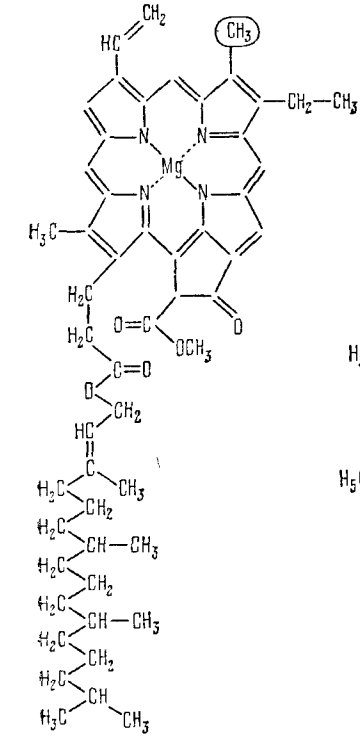
Скорость фотосинтеза можно представить эмпирической формулой, подобной формуле Михаэлиса — Ментен (с. 178):

$$v = \frac{(k_E/n)\,EI}{K + I}, \qquad (14.1)$$

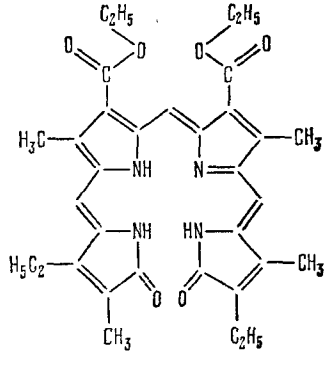
где k_E — константа скорости ферментативной реакции, $n \approx 8$, E — концентрация фермента.

Скорость v зависит от температуры. При большой интенсивности падающего света $I \gg K$ наступает насыщение, $v_{max} =$

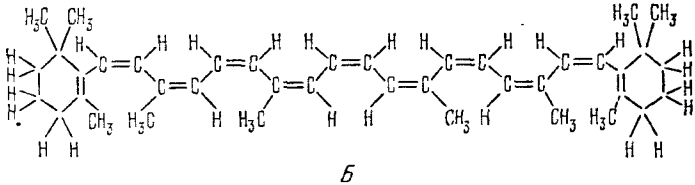
$= k_E E/n$. Величина k_E находится путем измерения зависимости выхода O_2 от продолжительности интервалов времени между вспышками t_d при импульсном освещении. Среднее время, необходимое для превращения одной молекулы субстрата, составляет ~0,02 с. Иными словами, $k_E = 1/0{,}02 = 50$ ($с^{-1}$). Концентрация



А



В



Б

Рис. 14.2. Структурные формулы некоторых пигментов: *А* — хлорофилл *a*, *В* — хлорофилл *b*, обведенная овалом группа — CH_3 заменена на —CH=O; *Б* — фикоэритробилин

$E = [Chl]/300$, [Chl] — концентрация хлорофилла. Получаем $v_{max} = 50\,[Chl]/n \cdot 300 \approx 0{,}02$ [Chl] $с^{-1}$. Максимальная скорость фотосинтеза при постоянном освещении равна одной молекуле O_2 на молекулу хлорофилла за 50 с.

Фотосинтетические единицы локализованы в *хлоропластах* — специальных органоидах клетки (см. § 14.4). В водных суспензиях хлоропластов с солями трехвалентного железа происходит *реакция Хилла* — фотохимическое выделение O_2 при участии добавленного окислителя. Наряду с Fe^{3+} таким окислителем могут быть хиноны, красители. Окислитель замещает систему $CO_2/(CH_2O)$. Источником O_2 при фотосинтезе *in vivo* и *in vitro* служит H_2O, а не CO_2, что доказано с помощью меченых атомов ^{18}O. Независимо от фотосинтеза происходит дыхание, т. е. поглощение O_2. На свету измеряется разность этих двух процессов. Скорость дыхания не зависит от освещения.

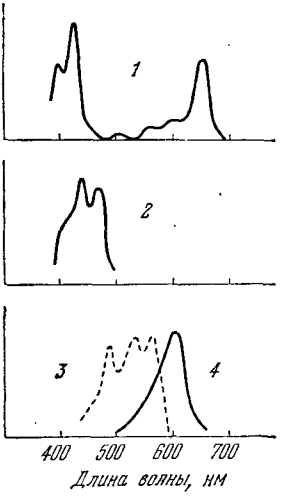


Рис. 14.3. Полосы поглощения хлорофилла *a* (*1*), каротиноида (*2*), фикоэритрина (*3*) и фикоцианина (*4*). По оси ординат — оптическая плотность

Основная проблема физики и химии фотосинтеза состоит в раскрытии механизма преобразования энергии света в химическую энергию. В 1948 г. была открыта модельная *реакция Красновского* — обратимое фотовосстановление хлорофилла:

$$Chl + AH \overset{\hbar\omega}{\rightleftarrows} Chl^- + AH^+.$$

Восстановителем, т. е. донором электронов, служил аскорбат AH. Восстановленный хлорофилл может быть окислен вновь. *In vivo* первая стадия процесса есть окисление хлорофилла. Возбужденные светом молекулы хлорофилла восстанавливаются в конечном итоге за счет воды. Электронные уровни хлорофилла показаны на рис. 14.4. В темноте молекула находится на нижнем синглетном уровне S_0. Полосы поглощения Chl соответствуют переходам $S_0 \rightarrow S^*$ (в красной области спектра) и $S_0 \rightarrow S_1^*$ (в синей области). Обратный переход $S_1^* \rightarrow S^*$ — безызлучательный, переход $S^* \rightarrow S_0$ — флуоресцентный. С уровня S^* возможен и безызлучательный переход на метастабильный триплетный уровень T.

При поглощении света в состоянии T хлорофилл переходит в возбужденное триплетное состояние T^*. Теренин провел общее рассмотрение роли триплетных состояний в фотохимии красителей. Она определяется большим временем жизни и химической ненасыщенностью вследствие наличия неспаренных электронов. Обратимое фотовосстановление хлорофилла можно представить схемой

$$Chl + \hbar\omega \rightarrow Chl^* \rightarrow \cdot Chl \cdot (T), \quad \cdot Chl \cdot + AH \rightleftarrows \cdot Chl^- + \cdot AH^+.$$

Точка изображает неспаренный электрон. Возникновение свобод-

ных радикалов при фотовосстановлении хлорофилла было доказано методом ЭПР.

Спектр поглощения Chl *a* имеет сложную полосу в красной области. Это заставляет думать о нескольких формах хлорофилла. Установлено наличие двух форм — Chl *a* и Chl *b*. Красная полоса поглощения смещается, когда листья растения, выросшего

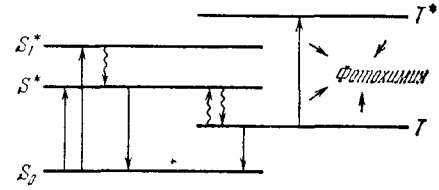


Рис. 14.4. Электронные уровни хлорофилла по Красновскому

в темноте, постепенно зеленеют на свету. Спектр поглощения изменяется и при постепенной экстракции хлорофилла из листьев. Это объясняется наличием Chl *a* и Chl *b*, а также их различной агрегацией.

Энергия света, поглощенная хлорофиллом и другими пигментами, может запасаться, мигрировать от молекулы одного пигмента к молекуле другого и между тождественными молекулами, излучаться (флуоресценция и фосфоресценция) и рассеиваться, превращаясь в тепло. Во всех случаях первичный акт фотохимического процесса состоит в поглощении света. По-видимому, одна из функций вспомогательных пигментов состоит в снабжении энергией хлорофилла *a*.

Спектром действия называется зависимость скорости продукции кислорода P от числа поглощенных квантов I_a и длины волны λ, т. е. функция

$$f(\lambda) = P/I_a. \qquad (14.2)$$

Если P — число молекул O_2, продуцируемых в 1 с, I_a — число квантов, поглощаемых в 1 с, то $f(\lambda) \equiv \Phi(\lambda)$ — квантовый выход фотосинтеза. При выделении одной молекулы O_2 поглощается 8 квантов. Кривая $\Phi(\lambda)$ для хлореллы показана на рис. 14.5. Характерно «*красное падение*» — резкое уменьшение $\Phi(\lambda)$ в области 680 нм. Оно наблюдается и в спектре действия реакции Хилла. Но при этом хлоропласты продолжают поглощать свет.

Красная полоса Chl *a* состоит из двух компонентов, 670 и 680 нм, примерно равной интенсивности. Есть указания и на третью слабую компоненту при 695 нм. Может быть, эти компоненты отвечают разным формам Chl *a*, различающимся фотохимической эффективностью, чем и объясняется «красное падение»?

Действительное объяснение более сложно. Существует *эффект Эмерсона*, состоящий в том, что свет, неэффективный в далекой красной области, становится эффективным при одновременном освещении системы более коротковолновым светом, например при комбинированном воздействии светом с $\lambda = 700$ и 650 нм.

Действие двойного облучения резко неаддитивно. Эффект Эмерсона выражается величиной

$$\varepsilon = (x - y)/z,$$

где x — скорость выделения O_2 при двойном облучении, y — при коротковолновом, z — при длинноволновом облучении. Значение ε особенно велико, когда бо́льшая часть добавочного длинноволнового света поглощается вспомогательным пигментом. Для полной эффективности фотосинтеза нужно поглощение одного кванта хлорофиллом *a* и другого — вспомогательным пигментом. Красное падение происходит в области, в которой свет поглощает только Chl *a*. Детальное исследование показало, однако, что наряду с максимумами ε(λ), соответствующими вспомогательным пигментам, в полосе поглощения Chl *a* имеется максимум при 680 нм. Этот максимум связан с резонансным переносом энергии возбуждения с других пигментов на активную форму Chl *a*.

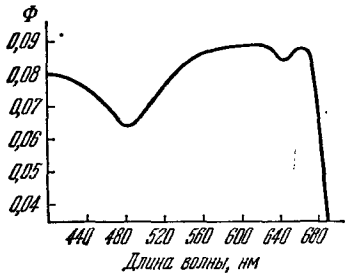


Рис. 14.5. Спектр действия для хлореллы

§ 14.2. Две фотохимические системы

Изложенные факты и другие данные, в частности биохимическое разделение, доказывают, что в фотосинтезе участвуют две фотохимические системы ФСI и ФСII. В зеленых растениях ФСII содержит Chl *a* с максимумами поглощения 670 и 680 нм, но не 695 нм. ФСI содержит все три формы Chl *a*. ФСII флуоресцирует сильно, ФСI — слабо. Кванты, поглощенные хлорофиллом 670 и 680 нм, переносятся в ФСI на Chl *a* 695, и энергия их диссипирует, чем и объясняется низкий выход флуоресценции. ФСII содержит больше Chl *a* 670, чем ФСI. Свет поглощается в обеих системах одновременно, но в разной степени. При $\lambda > 650$ нм в красных водорослях и при $\lambda > 680$ нм в зеленых водорослях система I получает избыточную, а система II недостаточную энергию — нарушается баланс, необходимый для совместной работы двух систем. Баланс этот улучшается при одновременном освещении более коротковолновым светом. Так объясняется эффект Эмерсона и «красное падение».

Если световые реакции, определяемые ФСI и ФСII, происходят последовательно, то можно установить спектр поглощения каждой системы, измерив спектры действия фотосинтеза при сильном, но не насыщающем воздействии светом, поглощаемым другой системой. Скорость общей реакции при этом определяется лимитирующим процессом. Если избыточный свет поглощается ФСI, то скорость реакции и спектр действия лимитируются ФСII,

и наоборот. Таким способом были установлены спектры поглощения обеих систем (рис. 14.6). ФСI содержит больше Chl *a* 680 и 695 нм, ФСII — больше Chl *a* 670 нм и Chl *b*. Нельзя считать, что Chl *a* 670 сенсибилизирует одну реакцию, а Chl *a* 680 — другую. Обе реакции связаны друг с другом относительно медленным темновым процессом. Эффект Эмерсона наблюдается и при

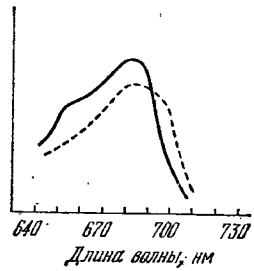


Рис. 14.6. Спектры поглощения ФСI (штриховая кривая) и ФСII (сплошная кривая) в хлорелле. По оси ординат — оптическая плотность

вхождении в реакционный сосуд двух взаимно перпендикулярных пучков света разной длины волны. При таких условиях коротко- и длинноволновый свет поглощается клетками водорослей в разное время. Эффект Эмерсона обнаруживается при прерывистом воздействии света с разной длиной волны с интервалом между вспышками в несколько секунд. В красных водорослях *Porphyridium* выделение O_2 при вспышке зеленого света усиливается, если ей предшествует вспышка красного света, поглощаемого Chl *a* в ФСI. Значит, получается долгоживущее промежуточное соединение. Время его полураспада оценивается в 18 с. Напротив, выделение O_2 при вспышке красного света не усиливается, если ей предшествует вспышка зеленого; зеленый свет, поглощаемый ФСII, не создает долгоживущих промежуточных соединений.

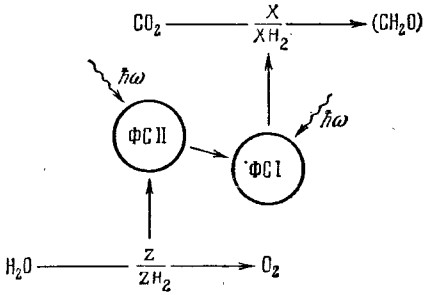


Рис. 14.7. Схема фотосинтеза с двумя стадиями, сенсибилизированными ФСI и ФСII

На рис. 14.7 показана схема фотосинтеза, уточняющая схему на рис. 14.1.

Каким образом поглощенные кванты распределяются между двумя системами так, что они работают с одинаковыми скоростями? По-видимому, ФСI и ФСII пространственно разделены, как о том свидетельствуют опыты по фракционированию вещества хлоропластов. Сбалансированное возбуждение определяется наличием в обеих системах одинаковых пигментов, хотя и в разных пропорциях. Квантовый выход фотосинтеза должен при этом

иметь минимумы в областях, в которых одна из систем поглощает свет сильнее, чем другая. Соответствующая тонкая структура спектра действия наблюдается. Функционирует лабильный фотобелковый комплекс, перемещающийся из одной области тилакоида в другую.

Изучение дифференциальных спектров поглощения дало богатую информацию о двух фотохимических системах. Дифференциальные спектры исследуются при одновременном поглощении

Таблица 14.1. **Свойства хлорофиллов I и II (Витт)**

Свойства	Chl a_I	Chl a_{II}
Тип реакции	Донор электрона	Сенсибилизатор (?)
Полосы поглощения, нм	438, 660, 682—703	435, 640, 682
Время появления, нс	$\leqslant 20$	$\leqslant 0$
Время жизни (20°С), мс	20	0,2
Область возбуждения	<730	<700
Температура инактивации, °С	65	45

света, возбуждающего фотосинтез, и слабого аналитического света. Возбуждающий пучок направлен перпендикулярно к аналитическому. Исследуются изменения в дифференциальном поглощении слабого света при наличии сильного монохроматического освещения (в частности, вспышечного) по сравнению с темнотой. Варьируя длину волны возбуждения, удается получить спектр действия и определить пигменты, сенсибилизирующие изменения в поглощении. Этот метод был развит Дейзенсом (1956), а вспышечная техника в работах Кока (1963) и Витта (1959). Вспышечная методика позволяет измерять времена жизни промежуточных соединений и времена их появления и исчезновения в интервале от 10^{-1} до 10^{-8} с.

Этими способами установлено участие каротиноида в фотосинтезе, переходящего при освещении в метастабильную форму. При избыточном освещении энергия диссипирует через эту форму. Каротиноиды защищают хлорофилл от фотоокисления при избытке света. В фотоокислении участвуют специальные формы Chl *a*, входящие в фотореакционный центр. Фотоокисление Chl a_I (Chl *a* в ФСI) определяется переходом электронов на первичный акцептор с последующим переносом на $НАДФ^+$. Установлена стехиометрия 1 : 1 окисления a_I и восстановления $НАДФ^+$. Конечным донором электрона для Chl a_I служит вода.

Свет с $\lambda < 700$ нм вызывает обратимые изменения поглощения Chl a_I. За окислением следует восстановление в течение 20 мс. В области 700—730 нм окисление Chl a_I необратимо. Пигмент реакционного центра ФСII возбуждается лишь при $\lambda < 700$ нм. Это, по-видимому, также Chl *a* (Chl a_{II}). Различие

Chl a_I и Chl a_{II} определяется различием в их окружении. Время жизни Chl a_{II} на два порядка меньше, чем Chl a_I. Свойства этих хлорофиллов представлены в табл. 14.1. Связь ФСI и ФСII осуществляется посредством подвижных переносчиков и переносчиков электронов, входящих в так называемый b — f-комплекс.

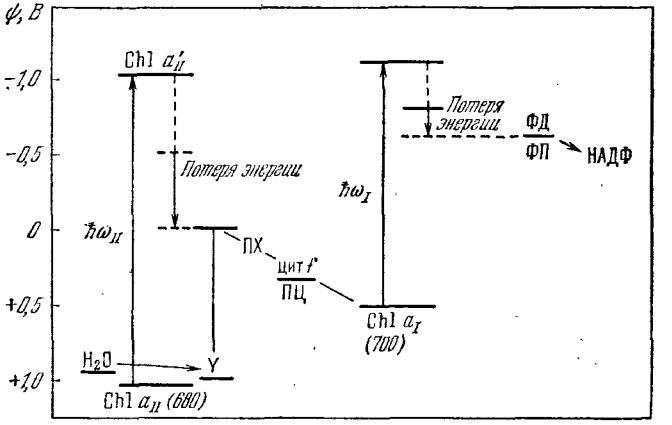


Рис. 14.8. Энергетическая схема событий в ФСI и ФСII: ПЦ — пластоцианин, ПХ — пластохинон, ФД — ферредоксин, ФП — флавопротеид

Комплекс этот содержит железо-серный белок, цитохром f, две молекулы цитохрома b_{563} и пластоцианин, являющийся связующим звеном между b — f-комплексом и ФСI. Пластохиноны (ПХ), участвующие в окислительно-восстановительных реакциях, восстанавливаются до гидрохинона при переносе двух электронов от Chl a_{II}. ПХ расположены в виде «пула», содержащего примерно пять молекул, между ФСI и ФСII.

На рис. 14.8 показана энергетическая диаграмма событий в ФСI и ФСII, а на рис. 14.9 — общая схема фотосинтеза — так называемая Z-схема.

Ценные сведения о двух фотохимических системах дает изучение флуоресценции. Квантовый выход флуоресценции Chl a (см. с. 452) составляет 30% *in vitro* и лишь 3—6% *in vivo*. Во втором случае флуоресцируют несколько форм Chl a, разнящиеся спектрами испускания и квантовыми выходами. Малый квантовый выход *in vivo* определяется эффективностью фотосинтеза — чем больше энергии идет на фотосинтез, тем слабее флуоресценция.

Акцепторы электронов в ФСI (см. рис. 14.9) в конечном счете восстанавливают $НАДФ^+$, который используется для фиксации CO_2. НАДФ является донором электронов в темновых процессах фиксации CO_2 (см. рис. 14.1). Вещество Z окисляет H_2O до O_2, XH_2 восстанавливает CO_2. Эти процессы являются ферментативными. Ферментная система, участвующая в выделении O_2,

содержит марганец. Ион Mn^{2+} участвует в реакции, фотокатализируемой ФСII. Конечный итог многоступенчатой реакции с участием Mn^{2+}

$$2Mn^{3+} + H_2O \rightarrow {}^1/_2O_2 + 2Mn^{2+} + 2H^+,$$

для чего нужна энергия, большая, чем +0,75 эВ.

В действительности имеется не менее двух предшественников — железосодержащий белок ферредоксин (ФД) и фермент

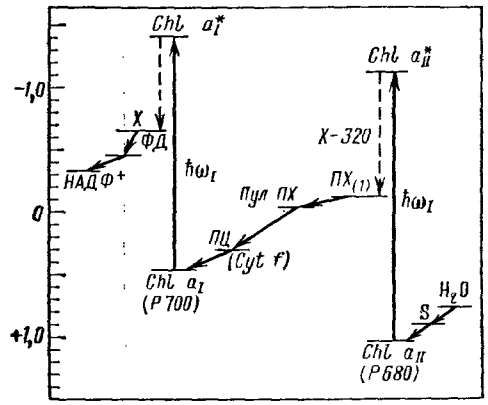


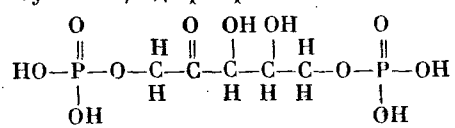
Рис. 14.9. Схема фотосинтеза (Витт); X, S — доноры и акцепторы электронов (потенциал — в вольтах)

ферредоксин-НАДФ-редуктаза. Освещенные хлоропласты восстанавливают пигмент вплоть до −0,60 В. Предположительно потенциал X близок к этой величине. Путь, ведущий от CO_2 к углеводу, известен лучше благодаря работам Кальвина и сотрудников, использовавших радиоактивную метку ^{14}C. Уравнение, описывающее фиксацию CO_2, имеет вид

$$6РДФ + 6CO_2 + 18\,АТФ + 12\,НАДФ.Н \rightarrow$$

$$\rightarrow 6РДФ + ГФ + 18\,АДФ + 17Ф_н + 12\,НАДФ.$$

Здесь РДФ — рибулозо-1,5-дифосфат



ГФ — гексозофосфат; РДФ — первичный акцептор CO_2. Путь углерода в фотосинтез — последовательность темновых реакций — описывается *циклом Кальвина*, состоящим из 13 стадий. Выше написана суммарная реакция. В сокращенных обозначениях

$$6C_5 + 6C_1 \rightarrow 6C_5 + C_6,$$

где индексы означают число атомов углерода в молекуле. Упрощенная схема цикла Кальвина показана на рис. 14.10. Результирующий ГФ гидролизуется с отщеплением фосфата. На образование одной молекулы гексозы из 6 молекул CO_2 расходуется энергия 18 молекул АТФ. Эти молекулы образуются при переносе электронов в процессе фотосинтеза — фосфорилируется

АДФ. Суммарная реакция:

$$НАДФ + n'АДФ + n'Ф_н + n\hbar\omega \rightarrow НАДФ.Н + $$
$$+ n'АТФ + O_2 + (n' - 2)H_2O.$$

Эта реакция реализуется в полной системе с участием пигментных систем и цепи переноса электронов.

Миграция энергии от поглощавших свет молекул на реакционные центры происходит по резонансному механизму. В принципе возможны и другие механизмы миграции. При полупроводниковом механизме возбуждение молекулы светом переводит

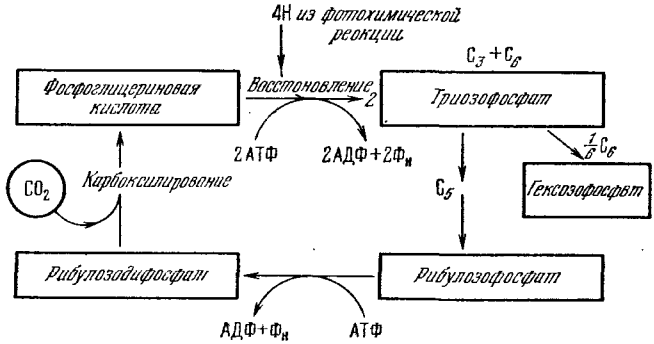


Рис. 14.10. Упрощенная схема цикла Кальвина

электрон в зону проводимости, после чего образовавшаяся пара разноименных зарядов (электрон и дырка) перемещается в упорядоченной молекулярной системе, в молекулярном кристалле. Однако в хлоропластах строгий порядок присущ лишь небольшим ансамблям молекул хлорофилла. Поэтому полупроводниковый механизм маловероятен. В то же время молекулярная упорядоченность в хлоропластах достаточна для миграции энергии по другим механизмам. Возможна миграция энергии триплетных возбужденных состояний или резонансная миграция экситонного или индуктивного типа. В двух последних случаях диполь-дипольное взаимодействие приводит к переносу энергии синглетного возбужденного состояния на невозбужденную молекулу. При экситонной миграции он происходит за времена, сравнимые с периодами колебаний — за $10^{-12} - 10^{-15}$ с, на расстояния до 1,5—1,8 нм. Это наиболее быстрый механизм. При миграции индуктивного типа ей предшествует установление термического равновесия возбужденной молекулы со средой, и скорость миграции сильно зависит от температуры. Ряд фактов свидетельствует в пользу быстрого экситонного механизма.

Первичные физические стадии фотосинтеза, начиная с поглощения кванта и кончая его захватом в реакционном центре, протекают за время, не превышающее ~100 нс. Эта величина на полтора-два порядка меньше характерных времен флуоресценции

молекул красителей, она является предельной для протекания реакций, лимитируемых диффузией. Такая быстрая миграция энергии обеспечивает высокий (более 90%) квантовый выход первичного процесса фотосинтеза.

§ 14.3. Хлоропласты

Фотосинтез происходит в органоидах растительных клеток, именуемых хлоропластами. На рис. 14.11 приведена электронная микрофотография среза хлоропласта из листа кукурузы. Диаметр хлоропласта 3—10 мкм, толщина 1,5—3 мкм. Хлоропласт заполняет почти всю клетку зеленой водоросли. На рис. 14.11 видны примерно параллельные *ламеллы*, погруженные в более светлую строму. У высших растений ламеллы образуют стопки, называемые *гранами*. Ламеллы представляют собой сечения уплощенных замкнутых мешочков — *тилакоидов*, имеющих диаметр около 500 нм. Их число в хлоропласте порядка 1000. Модель структуры хлоропласта показана на рис. 14.12. Процессы фотосинтеза локализованы в мембранах тилакоидов, в которых содержатся активные пигменты, прежде всего хлорофилл. Фрагменты тилакоидов реализуют реакции фотоиндуцированного транспорта электронов и сопряженное с ним фотофосфорилирование. В мембранах находятся светособирающие и электронно-транспортные комплексы, и АТФ-синтетазы хлоропластов.

Исследование тилакоидов методом электронной микроскопии показывает, что они содержат регулярные кристаллоподобные

Таблица 14.2. **Состав граны из тилакоида шпината**

Липидная фракция (число молекул)	М. м.	Белковая фракция	М. м.
230 хлорофиллов	206 400	Белки	928 000
48 каротиноидов	27 400	2 атома Mn	110
48 хинонов	31 800	12 атомов Fe	672
116 фосфолипидов	90 800	6 атомов Cu	218
144 дигалактозилдиглицеридов	134 000		
366 моногалактозилдиглицеридов	268 000		
48 сульфолипидов	41 000		
Стероиды	15 000		
Неидентифицированные липиды	175 000		
Итого	989 400	Итого	929 000

системы плотно упакованных гран. Граны в тилакоидах шпината имеют размеры $18{,}5 \times 15{,}5 \times 10$ нм^3. М. м. граны оценивается в $2 \cdot 10^6$. Зная состав ламелл, можно определить число молекул различных веществ в гране. Соответствующие данные приведены в табл. 14.2.

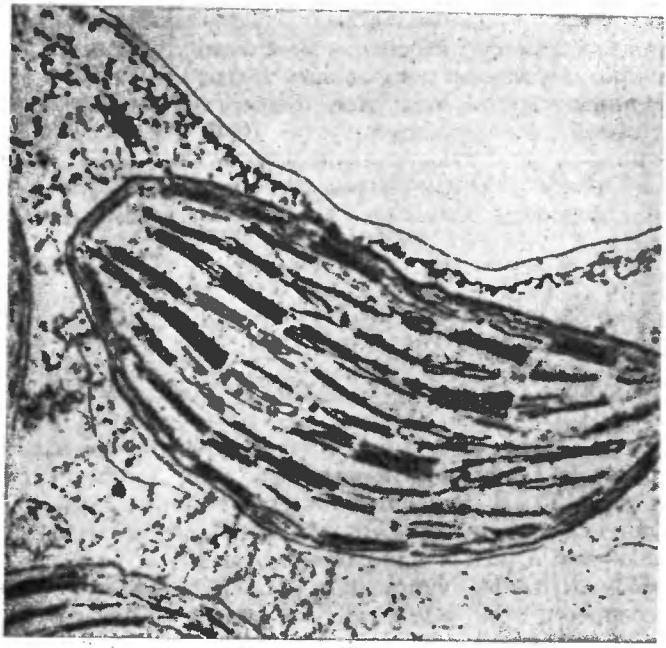


Рис. 14.11. Электронная микрофотография среза хлоропласта

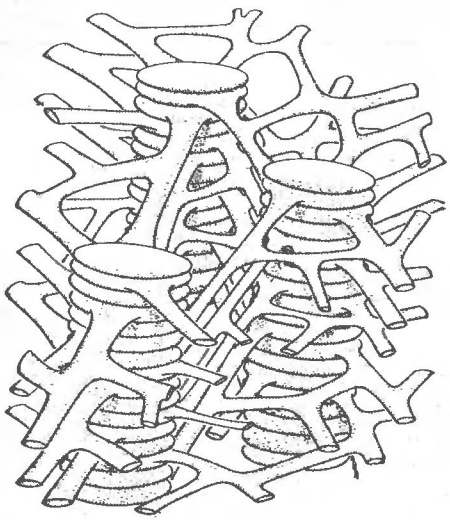


Рис. 14.12. Модель структуры хлоропласта

Число молекул хлорофилла, равное 230, согласуется с независимой оценкой для фотосинтетической единицы (см. с. 448).

Были проведены опыты со слоями Chl *a*, Chl *b* и каротиноидов на стеклянных пластинках. Слои подвергались действию электрических полей с напряженностью до 10^6 В/см и измерялись изменения поглощения. Они оказались совпадающими с изменениями в хлоропластах, индуцированными светом. Изменение поглощения $\Delta A = \Delta I/I$ линейно зависит от изменения потенциала $\Delta\psi$:

$$\Delta\psi = q/C = b\Delta A. \qquad (14.3)$$

Здесь q — заряд, перенесенный через мембрану, $C \approx 1$ мкФ — ее емкость, $b \approx 50$ мВ/ΔA. Ток равен

$$i = C\frac{d\Delta\psi}{dt} = Cb\frac{d\Delta A}{dt}. \qquad (14.4)$$

При вспышке, вызывающей один оборот, через мембрану переносится два элементарных заряда на одну электронную цепь. При этом $\Delta\psi \approx 50$ мВ, при длительных вспышках $\Delta\psi_{max} \approx 200$ мВ, при стационарном освещении $\Delta\psi \approx 100$ мВ. Поле создается наполовину реакцией в ФСI и наполовину — в ФСII.

Установлены также изменения pH, обусловленные электронным транспортом. При освещении хлоропластов внутри тилакоидов может происходить накопление протонов и понижение pH. Отношение числа поглощенных протонов к числу перенесенных электронов равно двум.

При короткой вспышке $\Delta\psi \approx 50$ мВ, но pH много меньше единицы. В этих условиях образование АТФ протекает независимо от ΔpH. Показано, что при единичной вспышке фосфорилирование действительно происходит за счет $\Delta\psi$ с выходом АТФ 0,30 на вспышку и независимо от интервала между вспышками. Фосфорилирование блокируется грамицидином D.

§ 14.4. Механизм фотосинтеза

На рис. 14.13 показана общая схема сопряжения различных процессов в тилакоидной мембране при фотосинтезе, предложенная Виттом (1971). На рисунке указаны схематически следующие события:

1. Миграция и диссипация энергии. Энергия запасается и затем диссипирует в возбужденных пигментах, а также в результате флуоресценции.

2. Световые реакции в ФСI и ФСII.

3. Образование электрического поля вследствие направленного переноса электронов перпендикулярно к мембране, определяемого анизотропной ориентацией ее молекул.

4. Перенос электронов и сопряженный с ним перенос протонов внутрь тилакоидов. Возможный механизм — протеолитические реакции, сопряженные с переносом электрона от H_2O к НАДФ$^+$. Образование ΔpH вследствие этих реакций.

В результате на свету образуется неравновесное распределение ионов между внутренней и внешней сторонами мембраны тилакоида. Это интерпретируется как возникновение энергизованного состояния мембраны. Разрядка этого состояния приводит к фосфорилированию.

Изменение концентрации протонов внутри тилакоидов регулирует скорость переноса электронов между ФСI и ФСII.

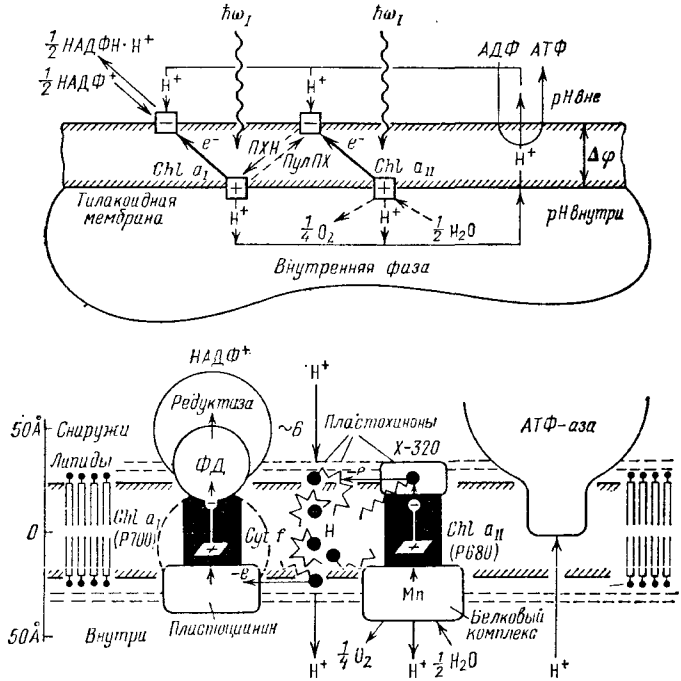


Рис. 14.13. Схема молекулярных процессов в фотосинтезе по Витту

Возможны ионообменные процессы — замена OH^- на Cl^- и протона на K^+.

В темноте происходит диффузионная убыль ΔpH.

Фотосинтез — сложная совокупность фото- и электрохимических процессов, детальные механизмы которых еще во многом не установлены. При количественных оценках применение теории Митчелла к фотосинтезу встречается с трудностями. В этой теории свободная энергия протонов должна превышать энергию фосфорилирования:

$$n_H G_H \geqslant G_\Phi. \qquad (14.5)$$

Здесь $G_\Phi \approx 0{,}5$ эВ $= 48{,}3$ кДж/моль, n_H — число перемещаемых протонов. В естественных условиях при $\Delta\psi = 50$ мВ и $\Delta pH \approx \approx 2 - 2{,}5$

$$G_H = e\Delta\psi + \kappa T \cdot 2{,}3\,\Delta pH \approx 0{,}18 \text{ эВ}. \qquad (14.6)$$

Следовательно, $n_н$ должно быть не менее трех. Опыт дает близкую оценку — для синтеза 1 моля АТФ нужно 4 протона. С другой стороны, из отношения $АТФ/2e^- = 2$ и $H^+/e^- = 2$ следует, что на 1 моль АТФ расходуется 2 протона. Энергия их составляет 0,36 эВ, т. е. меньше требуемой для синтеза АТФ, и неравенство (14.5) не соблюдается — энергии одного протона не хватает. Несоответствие проявляется более ярко в условиях импульсного освещения.

Для построения теории фосфорилирования при фотосинтезе необходимы дальнейшие исследования.

На определенных участках цепи наблюдается независимость скорости процесса от температуры при низких температурах. Это привело к предположению о туннельном механизме переноса электронов между соседними носителями (Чанс и Де Во, а также Блюменфельд и Чернавский, см. § 13.4).

Перенос электронов происходит между центрами, фиксированными в мембране тилакоида. Эти центры можно рассматривать как достаточно глубокие электронные ловушки. Можно представить центр потенциальной ямой и рассматривать уровни, которые занимает перемещаемый электрон. Решается задача о переносе электрона между двумя соседними компонентами цепи, т. е. между основными уровнями потенциальных ям, разделенных барьером (§ 13.4). При этом в фотосинтетической системе реализуются электронно-конформационные взаимодействия, к рассмотрению которых уместно подойти с помощью модели потенциальной ямы (см. § 6.6). После переноса электрона молекула акцептора оказывается в неравновесной конформации, медленно релаксирующей к равновесию. Это создает возможность сбалансированного резонанса и туннельного эффекта. Строгая количественная теория, однако, еще не построена.

§ 14.5. Зрение

Наряду с фотосинтезом важнейшим фотобиологическим процессом является процесс фоторецепции, состоящий в получении информации о факторах внешней среды посредством светового излучения. Рассмотрим наиболее совершенный вид фоторецепции — зрение позвоночных.

Схема устройства глаза показана на рис. 14.14.

Глаз — саморегулируемая система. Ее оптические недостатки в значительной мере компенсируются регуляторными механизмами, оптимизирующими работу глаза. Важнейшими из них являются фокусировка изображения на сетчатке и регуляция количества света, попадающего на сетчатку.

Фокусировка изображения на сетчатке производится посредством автоматического изменения радиуса кривизны хрусталика, т. е. посредством аккомодации. Управляющим устройством служит охватывающая хрусталик цилиарная мышца. Ее сокращение или расслабление возникает в ответ на дефокусировку изоб-

ражения. Система аккомодации является следящей, так как она удерживает в фокусе изображение удаляющегося или приближающегося объекта.

Для оптимизации работы глаза необходимо регулировать поступающее в него через зрачок количество света. Регулируется

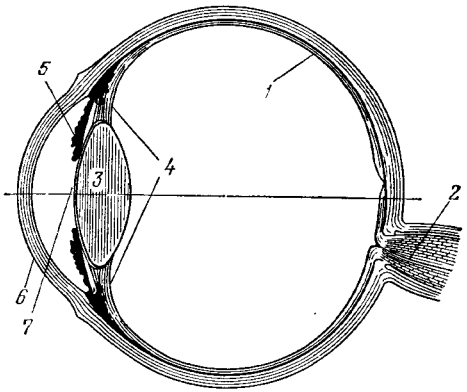


Рис. 14.14. Схема устройства глаза млекопитающего: *1* — сетчатка, *2* — зрительный нерв, *3* — хрусталик, *4* — цилиарная мышца, *5* — радужная оболочка, *6* — роговица, *7* — зрачок

величина оптического отверстия — зрачка. При высокой интенсивности света зрачок сужается, при низкой — расширяется. Это производится двумя мышцами-антагонистами, образующими радужную оболочку.

Феноменологическая трактовка такой системы основывается на общих положениях *теории управления*. В систему поступает *входной сигнал*, отличный от требуемого, от *«уставки»*. Разность входного сигнала и уставки — *сигнал ошибки*. Назначение регулятора состоит в получении требуемого *выходного сигнала*. Система регулирования состоит из регулятора и объекта управления, она содержит контур обратной связи.

Обратимся к строению *сетчатки*. Это многослойная структура, схематически изображенная на рис. 14.15. Слои клеток указаны в подписи к рисунку. Изображение возникает на пигментном эпителии *1*. В слое *3* осуществляется синаптическая связь фоторецепторных клеток *2* с нервными горизонтальными клетками *4*. Другие нервные клетки — биполярные *5* и амакриновые *6* — синаптически связаны в слое *7* с ганглиозными клетками *8*, которые являются непосредственными источниками импульсов, поступающих в аксоны зрительного нерва. Входной сигнал — оптическое изображение на пигментном эпителии, выходной — нейральное изображение, закодированное импульсами в зрительном нерве. Для того чтобы дойти до фоторецепторов, свет должен пройти сквозь слои нервных клеток — фоторецепторные клетки защищены тем самым от вредных воздействий.

Как *палочки*, так и *колбочки* представляют собой вытянутые структуры, построенные из многих специализированных компартментов, образующих последовательность параллельных дис-

ков. Схема палочки и колбочки лягушки показана на рис. 14.16. В дисках расположены фоторецепторные молекулярные устройства, посредством жгутиков необходимые вещества поступают к дискам из основного тела клетки. Свет поглощается в дисках молекулярной системой, описанной в следующем параграфе. Показано, что белки дисков непрерывно обновляются.

Установлено, что за цветное зрение ответственны колбочки, палочки воспринимают слабое освещение. Еще Ломоносов говорил о зрительном восприятии трех цветов — трех сортов частиц

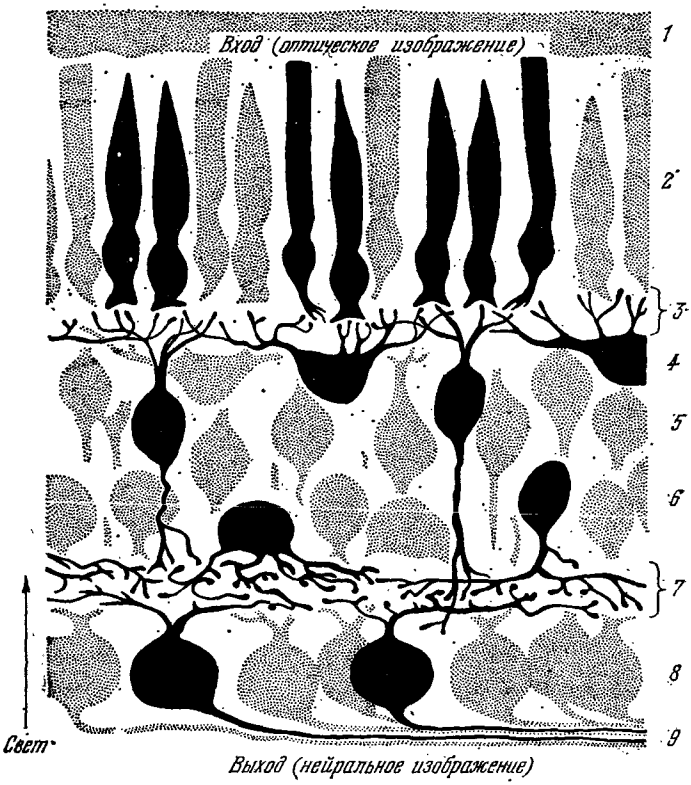


Рис. 14.15. Схема строения сетчатки: *1* — пигментный эпителий, *2* — рецепторные клетки (палочки и колбочки), *3* — внешний синаптический слой, *4* — горизонтальные клетки, *5* — биполярные клетки, *6* — амакриновые клетки, *7* — внутренний синаптический слой, *8* — ганглиозные клетки, *9* — волокна зрительного нерва

эфира — красных, желтых и голубых («Слово о происхождении света», 1756 г.). В 1802 г. Юнг предложил теорию цветного зрения, основанную на предположении о трех видах светочувствительных веществ в сетчатке. Далее теорию трехцветного зрения развивали Максвелл и Гельмгольц. Теория эта подтверждена прямыми измерениями поглощения света отдельными колбочками.

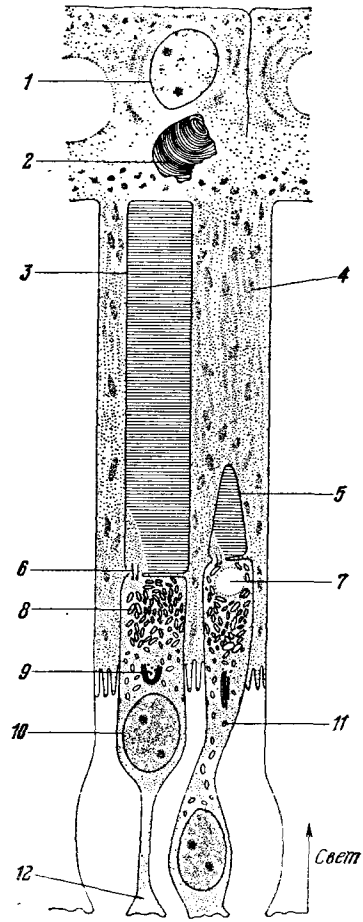


Рис. 14.16. Схема строения палочки (слева) и колбочки (справа) лягушки: *1* — ядро клетки пигментного эпителия, *2* — фрагмент, отделившийся от внешнего сегмента палочки, *3* — внешний сегмент палочки, *4* — гранулы пигментов, *5*— внешний сегмент колбочки, *6* — соединительные жгутики, *7* — капли жира, *8* — митохоидрии, *9* — комплекс Гольджи, *10*— ядро, *11* — рибосома, *12* — синаптическое тело

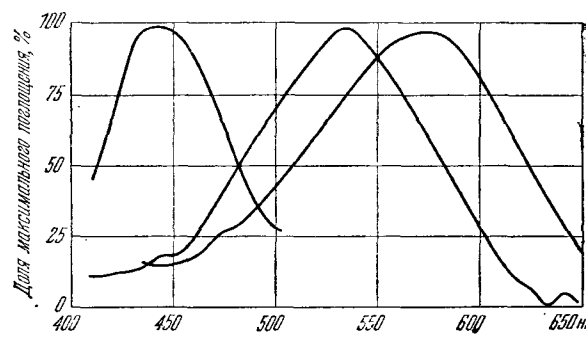


Рис. 14.17. Кривые спектральной чувствительности колбочек приматов с максимумами при λ 447 (сине-фиолетовый), 540 (зеленый) и 577 нм (желтый)

Имеются три сорта колбочек, характеризуемых различными кривыми поглощения зрительных пигментов. На рис. 14.17 показаны эти кривые для приматов. Кривые для человека очень с ними сходны.

Рецепторы беспозвоночных устроены иначе, они во многих случаях чувствительны в широкой спектральной области.

Механизмы трансформации оптического изображения на сетчатке в нейральное изображение, сообщаемое мозгу, весьма сложны. В сетчатке происходит адаптация к различиям в интенсивности и в спектральном составе света, восприятие объемного изображения и движения видимого объекта. Были проведены исследования импульсов, возникающих в оптических нервах краба и позвоночных. Глаз краба содержит множество рецепторов, именуемых *омматидиями*, похожих на палочки. Удалось изучить импульсы, создаваемые отдельными омматидиями в соответствующих отдельных аксонах. В темноте распространяются редкие периодические импульсы. При освещении с пороговой интенсивностью возникают дополнительные импульсы. Если интенсивность сильно превышает пороговую, то в момент освещения возникает короткая последовательность частых импульсов. Затем частота уменьшается, но остается существенно большей, чем темновая. При выключении света появляется новая пачка частых импульсов, их частота постепенно уменьшается до темновой. У позвоночных аксоны сильнее реагируют на изменения освещенности, чем на непрерывное освещение. Наблюдается подавление импульсов при сильном освещении. Функцией сетчатки является сложное, интегрирующее нервное взаимодействие, имеющее характер вычислительной работы. В этом смысле сетчатка подобна ЭВМ.

Горизонтальные и амакриновые клетки соединяют соседние фоторецепторы, обеспечивая передачу информации в латеральном направлении, биполярные клетки передают информацию внутреннему синаптическому слою. Исследование электрической активности отдельных клеток показало, что рецепторные и горизонтальные клетки (а также в некоторых случаях биполярные клетки) испытывают плавную гиперполяризацию при освещении, не создавая нервного импульса. Иными словами, их мембранный потенциал становится более отрицательным. Это необычное поведение для нейрона. Как правило, нейроны деполяризуются, приобретают положительный мембранный потенциал при возбуждении. Импульсы обычно распространяются в нервных клетках по их длине. В указанных видах нервных клеток сетчатки эти события не происходят. Напротив, положительные нервные импульсы возникают в амакриновых и ганглиозных клетках. Именно последние служат источниками импульсов, поступающих в головной мозг.

У беспозвоночных (кальмар) поведение палочек иное — они деполяризуются при освещении, т. е. ведут себя подобно обычным возбужденным нейронам.

Пороговая чувствительность глаза очень велика. После длительной адаптации человеческого глаза к темноте он способен воспринимать отдельные кванты и в этом отношении превосходит любой фотоэлемент. Вследствие независимости актов излучения отдельных атомов и молекул при достаточно слабом источнике света глаз оказывается в состоянии наблюдать *квантовые флуктуации* излучения. Это было впервые показано Барнесом и Черни в 1932 г.

В 1933 г. Вавилов с сотрудниками провел подробные визуальные исследования квантовых флуктуаций с помощью очень надежной методики. Были получены точные характеристики палочковой чувствительности глаза и важные данные о природе света. Позднее появились работы Хехта, посвященные той же проблеме.

Фоторецепторы многих беспозвоночных устроены иначе. Остановимся на эволюции фоторецепции. Уместно начать обсуждение со слов Дарвина («Происхождение видов»): «...Если мы будем иметь в виду, сколь малым должно быть число живущих форм по сравнению с теми, которые вымерли, трудность перестает быть слишком большой и мы можем верить, что естественный отбор мог превратить простой аппарат оптического нерва, покрытого пигментом и снабженного прозрачной мембраной, в оптический инструмент...».

Простейший вид фоторецепции — это *фототаксис*. Одноклеточное эвглена обладает оранжево-красным фоторецепторным пятном — стигмой. Можно думать, что этот фоторецептор возник эволюционно из жгутика или реснички, ассоциировавшей пигмент. Под действием света стигма создает своего рода нервный импульс в жгутике, и эвглена движется по направлению к свету. Как указывает Уолкен, детально исследовавший фототаксис, система стигма — жгутик может рассматриваться как серво-механизм с обратной связью, обеспечивающий максимальную освещенность организма.

Зная площадь фоторецептора, длину волны и интенсивность света, можно оценить энергию, необходимую для фототактического ответа. Для эвглены это очень малая величина — около $1{,}7 \cdot 10^{-11}$ эрг/(см^2 · с). Число фотонов, необходимое для возбуждения фоторецептора, равно семи. Скорость движения клетки оказывается пропорциональной числу поглощенных фотонов.

Получение зрительного изображения требует более тонкого устройства. Холдейн указывал, что возможны лишь четыре типа глаза, если определить глаз как орган, в котором свет, распространяющийся в одном направлении, стимулирует нервное волокно. Это — пучок трубочек, установленных по разным направлениям, и три типа устройств, подобных хорошо известным инструментам: камера с булавочным отверстием, обычная камера с линзой и телескоп-рефлектор. Булавочное отверстие служит фоторецепции у плоских червей — планарий. У дождевого червя светочувствительные клетки, наличествующие на поверхности

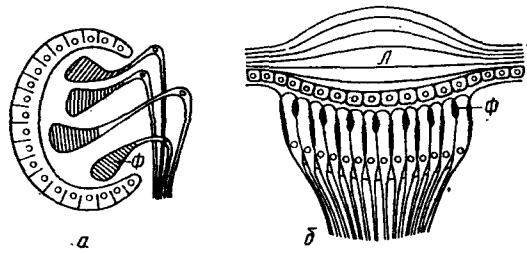


Рис. 14.18. Схема простого глаза: плоского червя (*а*), насекомого (*б*). *Л* — линза, *Ф* — фоторецептор

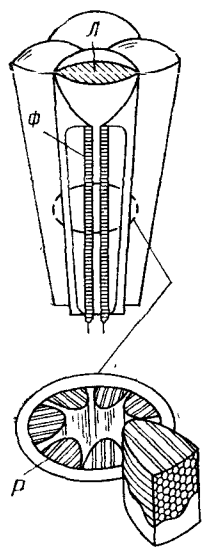


Рис. 14.19. Схема сложного глаза насекомого: *Л* — линза, *Ф* — фоторецептор, *Р* — рабдомер

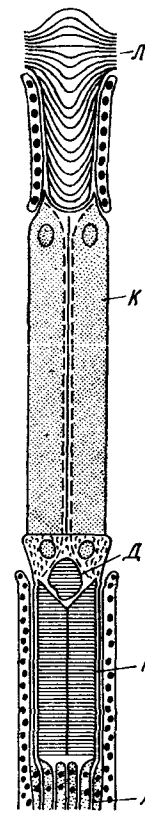


Рис. 14.20. Схема омматидия насекомого: *Л* — линза, *К* — кристаллический конус, *Д* — дистальный рабдомер, *Р* — рабдом, *А* — аксон

тела, содержат линзы. Клетки эти окружены нейрофибриллярной сеткой. У многих пиявок такие клетки объединены в устройство с общей линзой. Такое устройство показано на рис. 14.18, оно называется *ocellus* или простой глаз.

У членистоногих имеются сложные глаза, формирующие изображение. Это так называемые фасеточные глаза, построенные из *омматидиев*. Число омматидиев варьирует от немногих у определенных видов муравьев до более чем 2000 у стрекозы. Каждый омматидий содержит роговичную линзу, кристаллическую колбочку и от 3 до 11 чувствительных клеток. В этих клетках помещаются фоторецепторные структуры — *рабдомеры*, функция которых подобна функции внешнего сегмента палочки позвоночного (рис. 14.19). Совокупность рабдомеров образует *рабдом*, *служащий фоторецепторной областью внутри каждого омматидия*. На рис. 14.20 показана схема омматидия насекомого.

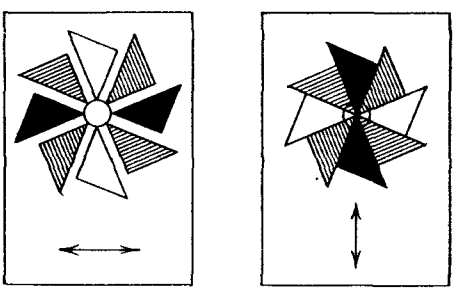


Рис. 14.21. Рабдомеры — анализаторы поляризованного света

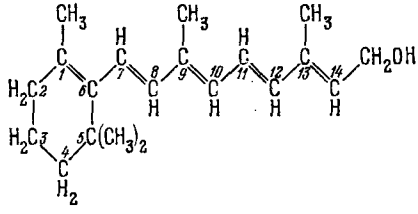
Фасеточные глаза способны определять плоскость колебаний поляризованного света. Это имеет адаптационное значение — направление поляризации указывает положение Солнца. Муравьи и пчелы пользуются Солнцем как компасом для навигации. Фриш построил модель рабдома, состоящего из восьми треугольных поляризующих элементов, каждый из которых пропускает свет пропорционально степени поляризации. Противоположные пары рабдомеров обладают параллельными поляризаторами. На рис. 14.21 показано, как такие рабдомеры могут действовать в качестве анализаторов поляризованного света. Изучение тонкой структуры фоторецепторов членистоногих подтверждает эту модель — имеется строгое геометрическое расположение перпендикулярных и параллельных микротрубочек, образующих рабдом.

Принципиальное строение глаза головного моллюска — осьминога, кальмара, каракатицы — сходно со строением глаза позвоночного. Глаз имеет роговицу, линзу (хрусталик), сетчатку. Природа производила выбор из немногих возможностей, и поэтому не следует удивляться сходству глаз у столь разнящихся животных.

§ 14.6. Молекулярный механизм фоторецепции

Человек и высшие животные воспринимают свет обычной интенсивности в области примерно от 400 до 760 нм. Ультрафиолетовый свет поглощается прозрачными тканями глаза. Инфракрасные лучи не воспринимаются сетчаткой. Если бы они воспринимались, то у теплокровных животных возникал бы сильный фон инфракрасной радиации, препятствующей рецепции информативных сигналов. Следовательно, пигмент или пигменты фоторецепторных клеток должны поглощать свет в видимой области спектра, т. е. быть окрашенными. Поскольку речь идет о молекулах органических соединений, отсюда следует, что это должны быть молекулы с достаточно протяженной системой π-связей — при малом числе сопряженных связей поглощается лишь ультрафиолетовое излучение (с. 140).

Действительно, в 1933 г. Уолд открыл присутствие *витамина А* в сетчатке, в «*зрительном пурпуре*». Структура витамина А была установлена несколько раньше. Витамин А (точнее, витамин A_1), или *ретинол*$_1$, имеет структуру



Брутто-формула ретинола$_1$ $C_{19}H_{27}CH_2OH$. Эта молекула представляет собой почти не измененную половину молекулы каротина (см. с. 49). Каротиноиды являются источником витамина А, отсутствие которого приводит к слепоте. В сетчатке позвоночных фигурирует и витамин A_2, или *ретинол*$_2$, структура которого отличается от приведенной наличием двойной связи между углеродами 2 и 3. Брутто-формула ретинола$_2$ $C_{19}H_{52}CH_2OH$. Ретинолы — спирты. В фоторецепторах ретинолы трансформированы посредством алкогольдегидрогеназы в альдегиды — в *ретиналь*$_1$ и *ретиналь*$_2$ и связаны с фосфолипидами и белками. В ретиналях конечная группа молекулы не $=CH-CH_2OH$, а $=CH-CH=O$, и брутто-формулы ретиналя$_1$ и ретиналя$_2$ $C_{19}H_{27}CHO$ и $C_{19}H_{25}CHO$. Число сопряженных π-связей в ретиналях на одну больше, чем в ретинолах.

Ретинали служат хромофорными группами зрительных пигментов, содержащих липопротеины, именуемые *опсинами*. Опсины колбочек и палочек разнятся. Соответственно возникают 4 основных вида зрительного пигмента, охарактеризованные в табл. 14.3.

Вслед за поглощением света в фоторецепторе должна возникать некая фотохимическая реакция. В *родопсине* ретиналь об-

разует *шиффово основание* в результате взаимодействия альдегидной группы ретиналя с аминогруппой опсина, а именно с ε-NH_2-группой лизина:

$$C_{19}H_{27}CH = O + H_2N - \text{опсин} \xrightarrow{-H_2O} C_{19}H_{27}CH = N - \text{опсин}.$$

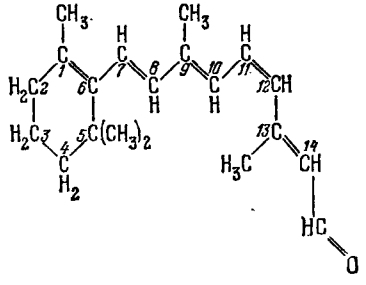
Бычий родопсин имеет м. м. 40 000. Если считать молекулу сферической, то ее диаметр составляет 4 нм. Размеры хромофора всего лишь вдвое меньше.

Под действием света ретиналь отщепляется от родопсина, аналогичные процессы протекают и в трех других случаях (см. табл. 14.3). Одновременно происходит фотоизомеризация ретиналя.

Таблица 14.3. **Зрительные пигменты**

Процесс	Максимум поглощения, нм
Ретинол$_1$ $\underset{\text{ДФН.H}}{\overset{\text{ДФН}^+}{\rightleftharpoons}}$ Ретиналь$_1$ + Опсин палочек $\overset{\text{свет}}{\rightleftharpoons}$ Родопсин	500
(Алкогольдегидрогеназа) + Опсин колбочек $\overset{\text{свет}}{\rightleftharpoons}$ Йодопсин	562
Ретинол$_2$ $\underset{\text{ДФН.H}}{\overset{\text{ДФН}^+}{\rightleftharpoons}}$ Ретиналь$_2$ + Опсин палочек $\overset{\text{свет}}{\rightleftharpoons}$ Порфиропсин	522
(Алкогольдегидрогеназа) + Опсин колбочек $\overset{\text{свет}}{\rightleftharpoons}$ Цианопсин	620

Комплекс опсина с ретиналем возникает за счет CH=N-связи и ряда слабых взаимодействий хромофора с белком. Эти взаимодействия оптимизируются в результате структурного соответствия ретиналя и опсина. Ретиналь может существовать в виде ряда изомеров, так как двойная связь C=C образует *транс-* или *цис*-конформацию. Наиболее устойчива сплошная *транс*-конфигурация, которая и показана для ретинола на с. 470. Установлено, что в комплексе с опсином в темноте ретиналь фигурирует в форме 11-*цис*:



В этой форме CH_3-группа у C_{13} и водород у C_{10} очень сближены и между ними возникает сильное отталкивание. Благодаря этому молекула несколько скручена, в ней нарушено плоское расположение π-связей. Тем самым уменьшена энергия сопряжения и 11-*цис*-форма должна быть менее стабильной, чем полная *транс*. Однако в комплексе с опсином проигрыш в энергии сопряжения перекрывается выигрышем в энергии взаимодействия с белком, наибольшей для 11-*цис*-формы.

При выцветании пигмента на свету ретиналь отщепляется от опсина и изомеризуется в наиболее устойчивую сплошную *транс*-форму. Цикл *цис-транс*-изомеризации является обязательной частью любой известной фоторецепторной системы.

В фоторецепции мы встречаемся не с конформационной перестройкой ретиналя, а с *цис-транс*-изомеризацией — повороты происходят вокруг двойных связей, а не единичных. Различие между ротамеризацией и *цис-транс*-изомеризацией количественное. В первом случае для конформационного превращения нужно преодолеть барьер порядка десятка кДж/моль (в этане 12,6 кДж/моль), во втором — при переходе 11-*цис*-ретиналя в полностью *транс*-форму — около 105 кДж/моль. Изомеры ретиналя устойчивы в растворе. Разности их энергий невелики — порядка 4—12 кДж/моль.

При возбуждении молекулы поглощаемым светом происходит перестройка π-электронной оболочки и барьер внутреннего вращения снижается до величины, соизмеримой с kT. Время жизни молекулы в синглетном возбужденном состоянии 10^{-9} с; время, нужное для поворота, 10^{-11}—10^{-12} с. Квантовый выход для реакции изомеризации 11-*цис* → полный *транс* составляет 0,5—0,7. Энергия кванта света более чем достаточна для изомеризации — кванту с $\lambda = 500$ нм отвечает энергия 210 кДж/моль.

Действуя светом разных длин волн на раствор родопсина в эквимолярной смеси глицерина с водой при температуре —190 °С, можно обратимо смещать равновесие изомеров, что находит свое выражение в сдвигах полосы поглощения. На основе такого рода исследований Уолд построил схему последовательных превращений родопсина, показанную на рис. 14.22. Под действием света ретиналь, находящийся в комплексе с опсином, изомеризуется, образуется прелюмиродопсин. При этом нарушается структурное соответствие ретиналя и опсина и последний вместе со связанным ретиналем испытывает конформационное превращение. Структура опсина постепенно раскрывается, возникают стадии, обозначаемые как люмиродопсин и метародопсины. На заключительной стадии шиффово основание гидролизуется и ретиналь отщепляется от опсина. При раскрытии опсина экспонируются новые химические группы, в частности, две SH-группы и группа, связывающая протон с pK порядка 6,6 (вероятно, имидазольная).

Таким образом, фоторецепция сводится к изомеризации хромофора, за которой следует изменение структуры липопротеи-

да — опсина. Конформационное превращение опсина приводит в конечном счете к возникновению нервного импульса.

Было показано, что выцветание и регенерация родопсина *in vitro* зависят от частоты коротких вспышек лазерного освещения. Поглощается лишь свет, поляризация которого отвечает определенной ориентации молекул родопсина. Тем самым существенно

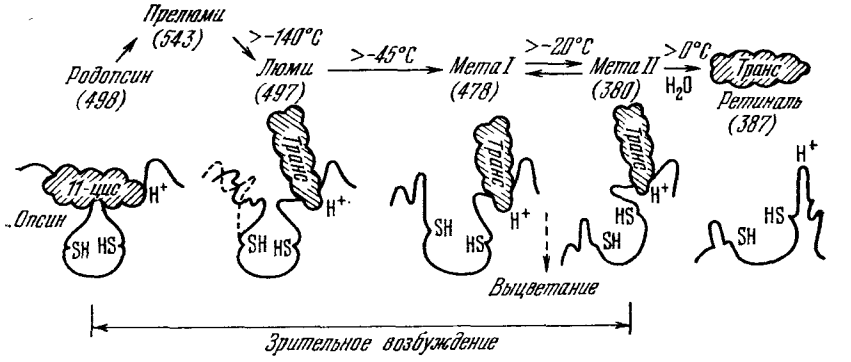


Рис. 14.22. Стадии выцветания родопсина. Ретиналь заштрихован. В скобках — значении λ_{max} в нм

соотношение между частотой вспышек и временем вращения молекул родопсина в растворе.

Различные формы зрительных пигментов характеризуются различными спектрами поглощения. Эти различия не сводятся к указанным в табл. 14.3. Полоса поглощения хромофора существенно зависит от его взаимодействия с опсином и, следовательно, от состояния липопротеида и его видовых особенностей. Так, сетчатка лягушки содержит два типа палочек («красные» и «зеленые») и два типа колбочек. Красные палочки содержат «классический» родопсин, зеленые — родопсин с полосой поглощения, сдвинутой в коротковолновую сторону. Спектральная чувствительность зрительных пигментов, как правило, коррелирует со спектральным составом света в среде, в которой существует данный организм. При переходе от голубоватой морской воды к желтоватой пресной воде родопсин в палочках рыб постепенно замещается порфиропсином. Морские рыбы имеют максимум чувствительности вблизи 505, пресноводные — вблизи 540 нм.

Факты и гипотезы, кратко здесь изложенные, ставят ряд задач, еще далеких от решения. Структура опсина, и тем самым родопсина, изучена недостаточно. Пока невозможно построение детализированной модели родопсина и его превращений на свету. Значительный интерес представила бы квантовая химия этих явлений.

Основная проблема, относящаяся к зрительной рецепции, состоит в установлении механизма, посредством которого первичный акт поглощения света и определяемое им изменение родо-

псина приводят к появлению нервного импульса. Процессы эти сейчас изучены для палочек, но не для колбочек.

Необходимо объяснить, каким образом поглощение одного фотона — глаз ведь это чувствует — вызывает импульс. Очевидно, что в такой трансдукции должен функционировать медиатор — вещество, создающее громадное усиление. С 1970 по 1985 г. считалось, что роль медиатора играют ионы кальция. В последнее время, главным образом благодаря работам Фесенко и сотрудников, выяснен — не до конца — иной механизм. Он состоит в следующем.

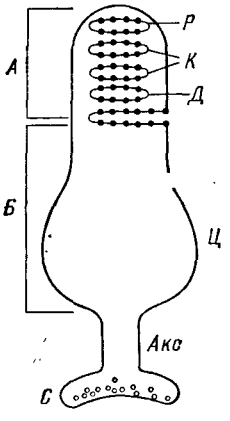


Рис. 14.23. Схема палочки: *А* — внешний сегмент, *Б* — внутренний сегмент, *Р* — молекулы родопсина, *К* — светочувствительные каналы, *Д* — диск, *Ц* — тело клетки, *Акс* — аксон, *С* — синапс

В плазматической мембране внешнего сегмента палочки (рис. 14.23) имеются каналы, по которым ионы Na^+ переносятся внутрь. Каналы эти открыты в темноте. При стимуляции палочки освещением каналы закрываются и происходит выключение темнового тока, гиперполяризации палочки, мембранный потенциал которой сдвигается от −30 до −70 мВ. Проводимость открытого канала составляет около 200 пикосименс. Каналы поддерживаются в открытом состоянии посредством циклического гуанинмонофосфата цГМФ.

Внешний сегмент палочек содержит 10^3 дисков, в каждом из них находится около 10^6 молекул родопсина. Поглощение одного фотона изменяет поток ионов на 1—2%, т. е. один фотон управляет 10^6—10^7 ионами.

Родопсин, испытавший превращение под действием света, уменьшает концентрацию цГМФ в каналах. Обесцвеченный родопсин активирует целый каскад ферментативных процессов, в котором важную роль играет белок трансдуцин. Этот белок распадается на субъединицы при взаимодействии с активированным родопсином — каждая молекула родопсина включает 10^2 молекул трансдуцина, которые, в свою очередь, активируют 10^3 молекул фосфодиэстеразы, что приводит к гидролизу цГМФ. Усиление, таким образом, достигает 10^5 раз. Процесс является скоростным, он проходит за 1 мс. Для срабатывания каскада, по-видимому, существенны жидкостные свойства мембран палочек позвоночных. На рис. 14.24 показана схема молекулы родопсина в мембране диска.

Методами рентгенографии и электронной микроскопии установлено, что в мембране диска при освещении происходят структурные изменения, масштаб которых пропорционален времени экспозиции. Суть этих изменений состоит в транслокации родопсина. В результате освещения родопсин переходит с междиско-

вой гидрофильной поверхности на внутреннюю гидрофобную фазу мембраны. Такого рода транслокации имеют характер фазовых переходов. Фазовые переходы в мембранах фоторецепторных клеток лягушки и кальмара были обнаружены и изучены методом дифференциальной калориметрии.

С помощью электронного парамагнитного резонанса была исследована фоторецепторная мембрана с введенным в нее спиновым зондом. При освещении суспензии мембран наблюдаются

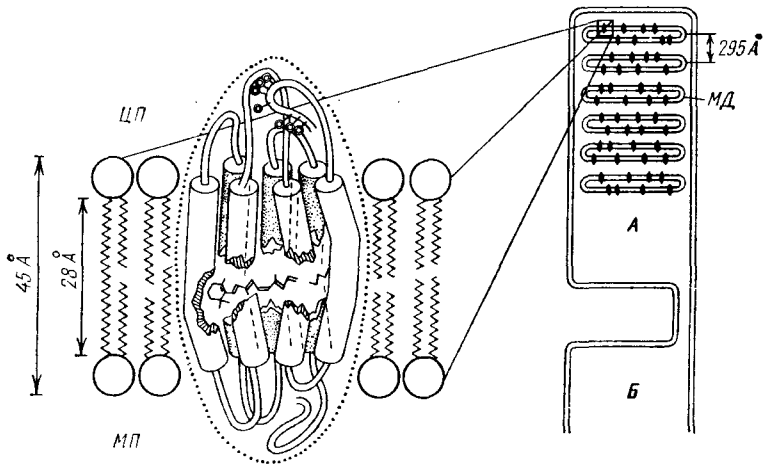


Рис. 14.24. Схема молекулы родопсина внутри мембраны диска: *ЦП* — цитоплазматическая поверхность, *МП* — междисковая поверхность, *МД* — мембрана диска, *А* — внешний, *Б* — внутренний сегменты палочки

значительные изменения спектров ЭПР, указывающие на увеличение времени вращательной диффузии зонда в мембране, τ. Форма кривой зависимости τ от длительности освещения свидетельствует о том, что фотолиз пигмента сопряжен с изменением конформационного состояния мембраны, с увеличением микровязкости ее гидрофобных областей. Эти результаты можно считать прямым доказательством конформационных превращений мембраны при освещении.

К сходным выводам приводит изучение фоторецепторных мембран методом гамма-резонансной спектроскопии (эффект Мёссбауэра). В качестве метки применялся аскорбат железа, обогащенный изотопом ^{57}Fe, источником γ-излучения служил ^{57}Co.

Именно на фоторецепторных мембранах лучше всего изучены жидкостные (жидкокристаллические) свойства мембран (ср. с. 337). Это оказалось возможным потому, что в фоторецепторных мембранах функционирует практически один лишь белок — родопсин, за которым легко следить.

Установлено, что палочки, адаптированные к темноте, обладают дихроизмом. Свет, поляризованный перпендикулярно к

длинной оси палочки, поглощается в несколько раз сильнее, чем свет, поляризованный параллельно этой оси. Следовательно, хромофор родопсина ориентирован параллельно плоскости мембраны диска. Однако на этой плоскости хромофоры ориентированы беспорядочно и дихроизма нет. Можно фотоиндуцировать *дихроизм*, проводя частичное выцветание родопсина с помощью плоско-поляризованного света. В обычных условиях дихроизм не возникает, что объясняется броуновским вращательным движением молекул родопсина в сетчатке. Однако при обработке сетчатки глутаровым альдегидом наблюдается очень сильный фотоиндуцированный дихроизм. Глутаровый альдегид образует сшивки, препятствующие вращению молекул родопсина. Перенос энергии между молекулами родопсина, среднее расстояние между которыми составляет около 7 нм, невозможен. Вращательная подвижность родопсина в сетчатке доказана. О том же свидетельствует изучение переходного фотодихроизма при импульсном фотолизе. При импульсном освещении происходит скачкообразное возрастание поглощения, определяемое превращением родопсина в прелюмиродопсин. Это возрастание значительно больше, если векторы поляризации действующего света и света, поглощение которого измеряется, параллельны, чем в том случае, когда эти векторы перпендикулярны. Вспышка индуцирует дихроизм, который быстро исчезает. Половинное время исчезновения дихроизма при 20 °С составляет $3{,}0 \pm 1{,}5$ мкс. С увеличением температуры этот процесс ускоряется. Увеличение вязкости среды замедляет исчезновение фотодихроизма.

Если зависимость от времени действительно определяется вращательной диффузией, то она описывается уравнением

$$\frac{\partial^2 n}{\partial \vartheta^2} = \tau \frac{\partial n}{\partial t}, \tag{14.7}$$

где n — доля хромофоров, ориентированных в интервале от ϑ до $\vartheta + d\vartheta$, ϑ — угол, составляемый хромофором с электрическим вектором вспышечного света, τ — время релаксации. Для линейного хромофора и вращательной диффузии вокруг оси, перпендикулярной к мембране диска, решение (14.7) имеет вид

$$n = 1 + fe^{-4t/\tau} \cos 2\vartheta. \tag{14.8}$$

Время t измеряется от начала вспышки, $f \leqslant 1$ — эмпирический множитель. Дихроичное отношение равно

$$\frac{\int_0^{\pi/2} n(\vartheta) \cos^2 \vartheta \, d\vartheta}{\int_0^{\pi/2} n(\vartheta) \sin^2 \vartheta \, d\vartheta} = \frac{2 + fe^{-4t/\tau}}{2 - fe^{-4t/\tau}}. \tag{14.9}$$

В идеальных условиях, когда $f = 1$, максимальное начальное отношение равно 3. Это отвечает значению, найденному для сет-

чатки, фиксированной глутаровым альдегидом. В импульсных опытах наблюдалось значение 2, отвечающее $f = 0{,}7$. Значение времени вращательной диффузии τ зависит от вязкости среды η, температуры и размеров хромофорной молекулы. Согласно Эйнштейну, для сферы радиуса r, испытывающей броуновское вращение вокруг некоторой оси,

$$\tau = \frac{8\pi r^3}{\kappa T}\eta. \qquad (14.10)$$

При 20 °С время τ для родопсина имеет значение около 20 мкс, $r = 2{,}2—2{,}8$ нм, родопсин приближенно сферичен и погружен в мембрану. Отсюда следует, что вязкость мембраны η около 0,2 Па · с (интервал от 0,07 до 0,6 Па · с), т. е. она близка к вязкости легкого масла, такого, как оливковое.

При поворотах молекулы родопсина, возникающих вследствие его конформационных превращений, меняется степень погружения родопсина в жидкую билипидную мембрану, что существенно для изменения ее ионной проницаемости.

Найденная константа диффузии для палочек из сетчатки лягушки равна $3{,}5 \pm 1{,}5 \cdot 10^{-9}$ см$^2 \cdot$ с$^{-1}$. Вязкость мембраны оказалась лежащей в том же интервале значений 0,1—0,4 Па · с. Время между столкновениями соседних молекул родопсина в сетчатке τ_c находится по формуле

$$s^2 = 4D\tau_c, \qquad (14.11)$$

где s — расстояние между молекулами родопсина. Если эффективный диаметр родопсина 4,5 нм, а расстояние между центрами молекул 7 нм, то $s = 2{,}5$ нм и $\tau_c = 4$ мкс, что в 5 раз меньше времени релаксации вращательной диффузии. Частота соударений составляет $10^5—10^6$ с$^{-1}$.

Эти результаты, полученные Коном и др., весьма интересны. Они дают основу для построения теории функционирования мембран, исходящей из их жидкостных свойств (ср. с. 337). Мы еще очень мало знаем о событиях, приводящих к возникновению нервного импульса в фоторецепторной системе. Можно думать, что эти события тесно связаны с поведением жидкой мембраны.

§ 14.7. Бактериородопсин

Родопсин функционирует не только в сетчатке глаза. В определенной области мембранной поверхности красных галобактерий (*Halobacterium halobium*) содержится белок бактериородопсин (БР). БР имеет м. м. 26 000, он состоит из одной молекулы белка, связанной с молекулой ретиналя через альдиминную связь. Максимум полосы поглощения БР лежит у 570 нм. *Галобактерии* — экстремальные галофилы, живущие в соленых озерах. Они обладают положительным фототаксисом на видимый свет и отрицательным — на ультрафиолетовый.

Вместе с липидами БР составляет систему, обеспечивающую транспорт протонов через мембрану против градиента pH. БР функционирует как фотоиндуцированный протонный насос (Остерхельт и Стекениус, 1971).

Работа протонного насоса в галофильных бактериях сопряжена с фосфорилированием АДФ и с работой натриевого насоса, обеспечивающей опреснение внутренней среды бактериальной клетки. По-видимому, теория Митчелла (§ 13.3) применима к этой системе. Имеются данные, указывающие на то, что зрительный родопсин также работает как фотогенератор, выполняя роль протонного насоса.

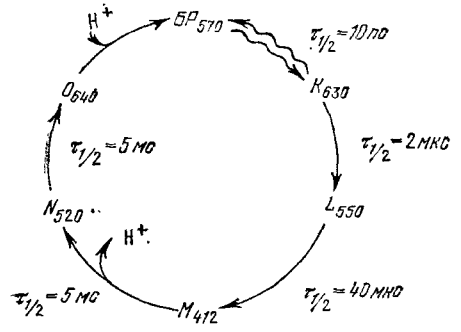


Рис. 14.25. Цикл функционирования бактериородопсина

В отличие от мембран палочек и колбочек пурпурная мембрана бактерий является скорее кристаллической, чем жидкой. Молекулы БР сгруппированы в кластеры по три и упакованы в гексагональную решетку, помещенную в плотный липидный матрикс. В середине кластера находится канал диаметром в 1—2 нм. Молекула БР α-спирализована на 70—80%. Каждая молекула содержит 7 палочкообразных α-спиралей длиной 3,5—4 нм, ориентированных перпендикулярно плоскости мембраны. Размеры белка $2{,}5\times3{,}5\times4{,}5$ нм^3. БР пронизывает мембрану насквозь и контактирует с водными фазами по обе ее стороны. Молекулы БР асимметричны (см. с. 335). Из величины переходного дипольного момента ретиналя (12 дебаев) следует, что при поглощении света электрон переносится на расстояние, сравнимое с расстоянием между концевыми группами ретиналя — циклогексеновым кольцом и шиффовым основанием.

В процессе фотоиндуцированного транспорта протонов происходят изменения конформации БР и его спектра. Светоадаптированная форма $БР_{570}$ входит в цикл фотоиндуцированных реакций с образованием ряда промежуточных соединений, что сопровождается переносом H^+ через мембрану и регенерацией исходной формы $БР_{570}$. Схема цикла показана на рис. 14.25. В результате одного оборота цикла при поглощении одного кванта света через мембрану переносится один протон. В определенной фазе цикла БР выделяет протон в кислую среду (pH 3,0), находящуюся по одну сторону мембраны. В другой фазе та же группа поглощает протон из щелочной среды (pH 12,0), находящейся с другой стороны мембраны.

Чернавская и Чернавский (1978) рассмотрели этот процесс на основе туннельного транспорта электронов, приводящего к внутримолекулярной трансформации энергии (см. § 13.4). Мо-

дель состоит из двух потенциальных ям, разделенных барьером (рис. 14.26). Ямы отвечают электронофильным группам — циклогексеновому кольцу ретиналя и азоту лизила (соединенному с ретиналем в шиффовом основании). В яме *I* имеются два уровня, расстояние между которыми равно энергии поглощаемого кванта. Уровень второй ямы несколько ниже верхнего уровня первой. Электрон возбуждается светом в яме *I*, туннелирует с верхнего уровня в яму *II*. Вследствие приближения протона происходит поляризация ямы *II*, сопровождающаяся понижением электронного уровня. Оказавшаяся заряженной положительно, поляризуется и яма *I* — электронные уровни в ней повышаются. Дальнейшее понижение уровня во *II* и повышение в *I* происходят в результате конформационных изменений, имеющих характер релаксации к новому равновесному состоянию, отвечающему новому распределению зарядов. После этого происходят обратное туннелирование электрона из *II* на нижний уровень *I*, новая поляризация обеих ям и конформационная релаксация к исходному состоянию. Цикл завершается. Условия резонанса, необходимые для туннелирования, обеспечиваются поляризацией и конформационными переходами.

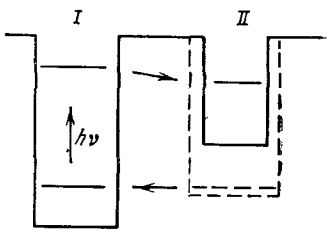


Рис. 14.26. Две электронофильные группы, разделенные барьером

Изменение свободной энергии протона при туннелировании электрона из *I* во *II* равно

$$\Delta G = \frac{e^2}{\varepsilon}\left(\frac{1}{r_2} - \frac{1}{r_1}\right), \qquad (14.12)$$

где $e = 4{,}8 \cdot 10^{-10}$ ед. СГСЭ — заряд электрона, $\varepsilon \approx 5$ — диэлектрическая проницаемость, r_2 — расстояние протона до центра ямы *II*, r_1 — до центра *I*. Для протона, расположенного близко к азоту шиффова основания и участвующего в его протонировании, $r_2 = 0{,}25$ нм, $r_1 = 1{,}3$ нм, тогда $\Delta G \approx 1$ эВ. Соответствующее изменение константы диссоциации этой группы $\Delta pK = \Delta G/2{,}3\kappa T = 17$. Изменение pK при обратном туннелировании того же порядка, но обратного знака. Эти оценки показывают, что изменения свойств рассматриваемой группы в результате туннелирования электрона могут покрыть весь интервал наблюдаемых pH — от 3 до 12.

Понижение электронного уровня для поляризации выражается сходным образом:

$$\Delta E = \frac{e^2}{\varepsilon}\left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2}\right), \qquad (14.13)$$

где r_1 и r_2 — расстояния протона от центра ямы до и после по-

ляризации. При $r_2 = 0{,}25$ нм и $r_1 = 0{,}15$ нм находим $\Delta E = 0{,}75$ эВ. Сдвиги уровней в результате конформационных изменений того же порядка. Сближение уровней, необходимое для обратного процесса, может быть реализовано.

Процесс состоит в протонировании шиффова основания, выделения и захвата этого и других протонов, в поляризации и ротамеризации ретиналя и родопсина. Нельзя считать, что эти явления изучены, несмотря на ряд интересных спектроскопических и кинетических исследований. Схема, предложенная Чернавскими, не противоречит имеющимся результатам, но нуждается в прямых подтверждениях.

Свойства бактериородопсина представляют существенный интерес для *биоэлектроники* — для создания искусственных запоминающих устройств на биологической основе. Полимерные пленки, содержащие БР, изменяют свой цвет при освещении, на них могут быть получены изображения, подобные фотографическим. В отличие от фотоэмульсий, содержащих бромистое серебро, изменения пленок с БР обратимы. В принципе такие пленки могут быть применены в компьютерах.

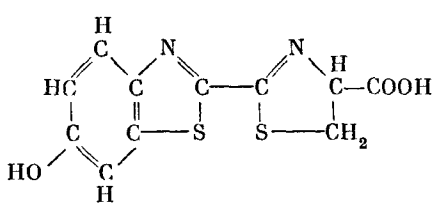
§ 14.8. Биолюминесценция

К фотобиологическим явлениям относится биолюминесценция — холодное свечение ряда живых организмов, начиная с бактерий и кончая рыбами (светящиеся представители других классов позвоночных не известны). Биолюминесценция более свойственна морским организмам, но всем хорошо известны жуки-светляки северных широт (*Lampyris noctiluca*) и летающие светляки черноморского побережья Кавказа (*L. mingrelica*).

Биолюминесценция есть хемилюминесценция — химическая реакция, сопровождающаяся испусканием видимого света (у различных летающих светляков длины волн лежат в интервале 550—595 нм). В реакции участвуют фермент *люцифераза* (Е), окисляемый субстрат *люциферин* (LH_2), кислород воздуха и АТФ:

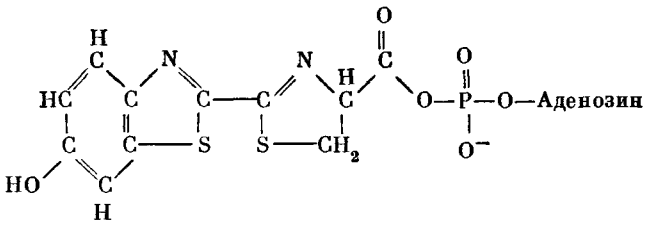
$$LH_2 + АТФ + O_2 \xrightarrow{E} L{=}O + АМФ + ФФ + CO_2 + \text{свет}.$$

Здесь ФФ — пирофосфат. Строение люциферина летающего светляка:



Это — карбоновая кислота, которая активируется в ходе реакции, идущей с участием АТФ с превращением в люцифериладе-

нилат (ЛФА):



ЛФА окисляется кислородом в присутствии люциферазы — расщепляется ацил-аденилатная связь и карбоксильная группа отщепляется в виде CO_2.

Люцифераза — белок с молекулярной массой около 50 000, не содержащий какого-либо кофактора. Структуры люциферинов других организмов отличаются от указанной.

Энергия испускаемых квантов значительно превосходит выделяемую при расщеплении АТФ. Так, свет, испускаемый светляками, при длине волны 560 нм имеет энергию 214 кДж на моль квантов, что на порядок больше энергии, выделяемой при расщеплении АТФ. В то же время АТФ необходима для свечения, и поэтому система люциферин — люцифераза является весьма чувствительным индикатором АТФ — по интенсивности люминесценции можно судить о количестве АТФ. Биолюминесценция, как уже сказано, есть хемилюминесценция, сопровождающая реакцию окисления, идущую, вероятно, через образование свободных радикалов. Энергия в виде света выделяется при их рекомбинации. В то же время синяя биолюминесценция медузы *Aequorea aequorea* происходит без участия O_2. *Aequorea* содержит фотобелок *экворин*, испускающий свет в присутствии ионов кальция. Роль Ca^{2+} состоит, по-видимому, в изменении конформации белка.

Биолюминесценция бактерий происходит с участием восстановленного флавинмононуклеотида (ФМН.H_2, ср. § 13.1). Предполагаемая схема процесса следующая:

$$\text{Люцифераза} + \text{ФМН.}H_2 \rightleftharpoons \text{Люцифераза. ФМН.}H_2,$$

$$\text{ФМН. }H_2 \xrightarrow{O_2} \text{ФМН} + H_2O,$$

$$\text{Люцифераза. ФМН.}H_2 + \text{R.CHO} \rightleftharpoons \text{Реактивный комплекс},$$

$$\text{Комплекс} + O_2 \rightarrow \text{Люцифераза} + \text{ФМН} + \text{RCOOH}.$$

ФМН.H_2 и альдегид R · CHO играют роль кофакторов люциферазы.

Механизмы биолюминесценции еще мало изучены, хотя они представляют очень большой интерес.

Специальные органы для биолюминесценции именуются *фотофорами*. В ряде случаев фотофоры имеют определенное сходство с фоторецепторными системами глаза. Некоторые из фото-

форов содержат структуры, подобные роговой оболочке глаза, или линзу и слой излучающих клеток, сходный с сетчаткой, содержащей фоторецепторные клетки. Система люциферин — люцифераза локализована в мембранах, подобно родопсину. Эволюционное происхождение сходства между фотофорами и фоторецепторами пока не понятно, равно как и адаптивное значение биолюминесценции бактерий и ряда других организмов. Высказывалось предположение о том, что биолюминесценция возникла в качестве биохимического способа для удаления кислорода, отравляющего соответствующие организмы. Использование органических восстановителей для удаления кислорода приводило к возникновению возбужденных состояний, способных излучать свет. Этому противоречит природа современных анаэробных бактерий, отравляемых кислородом, но не обладающих биолюминесценцией. Другое предположение состоит в том, что образование активированных молекул кислорода в ходе реакций, приводящих к излучению, может иметь адаптационное значение.

Флавины, участвующие в фотосинтезе, участвуют и в люминесцентных реакциях светляков. Биолюминесценция до некоторой степени подобна обращенному фотосинтезу. В планктонных водорослях *Gonyaulax* реализуются оба процесса — и фотосинтез, и биолюминесценция.

Имеется общая проблема единства и эволюционного происхождения различных фотобиологических процессов. Как мы видели, каротиноиды фигурируют и в фотосинтетических системах, и в фоторецепторах бактерий, и в органах зрения как позвоночных, так и беспозвоночных. В то же время имеется сходство между фотофорами биолюминесцентных систем и фоторецепторами. Это не означает, конечно, их единого эволюционного происхождения с последующей дивергенцией. Скорее можно думать о конвергенции — о совпадении структур и функций систем различного происхождения. Так, нельзя считать, что сходство глаза человека и осьминога свидетельствует об их общем предке. Напротив, это сходство означает, что эволюция разных филогенетических ветвей может решать одинаковые задачи сходными способами, так как число этих способов принципиально ограничено.

Так или иначе, физика фотобиологических процессов стоит перед большой совокупностью нерешенных проблем, имеющих принципиальное значение для биофизики и теоретической биологии.

Глава 15

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИЧЕСКИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

§ 15.1. Динамическая упорядоченность

В предыдущих главах мы не раз встречались с нелинейным поведением биологически функциональной системы. Достаточно вспомнить о генерации и распространении нервного импульса (гл. 11). При достижении порогового значения возбуждающей силы происходит переключение системы в новое состояние — генерируется нервный импульс. Генерация имеет триггерный характер. Сходные триггерные явления реализуются во всех случаях возникновения упорядоченного поведения биологических систем в пространстве и во времени.

Выше уже отмечались различия между равновесной, статической упорядоченностью и упорядоченностью динамической, свойственной открытым системам, далеким от равновесия,— *диссипативным системам* (§ 9.7). Остановимся на этом центральном вопросе теоретической биофизики еще раз. В этой и последующих главах мы рассмотрим ряд моделей биологических диссипативных систем, исходя из общих теоретических подходов к их поведению. В таких системах возникают процессы самоорганизации в пространстве и во времени. Мы уже указывали, что область естествознания, изучающая такие процессы, именуется *синергетикой*.

Начнем снова с термодинамических характеристик трех видов систем, с которыми нам приходится встречаться в биофизике.

Поведение изолированной системы полностью характеризуется вторым началом в его канонической форме — энтропия системы стремится к максимуму. Ни самоорганизация, ни фазовые переходы в такой системе невозможны.

Замкнутая система, обменивающаяся с окружающей средой энергией, но не веществом, способна к фазовым переходам в статическое, равновесное, упорядоченное состояние. Система характеризуется свободной энергией $G = H - TS$, стремящейся к минимуму. При достаточно низкой температуре энтропийный вклад в свободную энергию становится малым и возникает, например, статический кристаллический порядок.

В случаях открытых систем следует четко различать два типа поведения. Поведение системы, близкой к равновесию, описывается в рамках линейной термодинамики (гл. 9). Мы имеем

здесь дело с равновесными структурами, модифицированными вследствие ограничений, препятствующих достижению равновесия. Возникновение динамического порядка в этих условиях невозможно — стационарные состояния являются асимптотически устойчивыми, что иллюстрируется рис. 15.1. Зависимость функции диссипации σ от параметра ρ, описывающего систему, имеет минимум σ_0 в стационарном состоянии $\rho = \rho_0$ (теорема Пригожина, с. 317). При отклонениях ρ от ρ_0 система возвращается в состояние ρ_0 экспоненциально, без осцилляций.

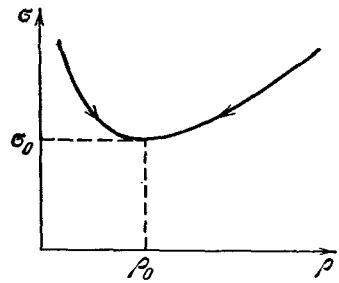


Рис. 15.1. Зависимость $\sigma(\rho)$ вблизи равновесия

И, наконец, в диссипативной системе, т. е. в открытой системе, далекой от равновесия, возникает динамическая упорядоченность, когерентное поведение ансамбля при переходе через значения параметров, характеризующих систему, отвечающие *неустойчивостям*.

Ситуации, свойственные открытым системам вдали от равновесия, описываются в прежних терминах — в макроскопических термодинамических переменных. Возникновение динамического порядка является результатом возрастания флуктуаций до макроскопического уровня. Имеется далеко идущая и весьма поучительная аналогия между этими процессами и *фазовыми переходами* — образование новой биологической структуры, образование нового вида, есть своего рода фазовый переход (см. § 15.5).

Критерием возможности возникновения дипамической упорядоченности в диссипативной системе является невыполнение условий устойчивости. Приведем вновь некоторые соотношения термодинамики открытых систем. *Функция диссипации* равна

$$\sigma = \frac{d_i S}{dt} = \sum_j J_j X_j \geqslant 0. \tag{15.1}$$

Ее изменение во времени записывается в виде

$$\frac{d\sigma}{dt} = \frac{d_J \sigma}{dt} + \frac{d_X \sigma}{dt} = \sum_j X_j \frac{dJ_j}{dt} + \sum_j J_j \frac{dX_j}{dt}. \tag{15.2}$$

При постоянных граничных условиях имеем

$$\frac{d_X \sigma}{dt} \leqslant 0. \tag{15.3}$$

Отсюда следует условие устойчивости рассматриваемого стационарного состояния

$$\sum_j \delta J_j \delta X_j \geqslant 0, \tag{15.4}$$

где δJ_j, δX_j — отклонения обобщенных потоков и сил от их ста-

ционарных значений. Вблизи равновесия это условие всегда выполняется. Применительно к химическим процессам оно имеет вид

$$\sum_j \delta v_j \delta \mathcal{A}_j \geqslant 0. \qquad (15.5)$$

Если условие (15.4) не выполняется, то стационарное состояние неустойчиво и возможно усиление флуктуаций, приводящее к возникновению динамического порядка. «Порядок через флуктуации» возможен, очевидно, лишь в такой открытой системе, поведение которой существенно нелинейно.

В биологии мы имеем дело с несколькими типами явлений, непосредственно свидетельствующих о нелинейности соответствующих процессов.

Во-первых, это любые триггерные, пороговые процессы переключения системы из одного режима в другой, например, генерация нервного импульса или сокращение мышцы.

Во-вторых, поведение клеток и организмов на всех уровнях организации подлежит регуляции и контролю, определяемым, в частности, обратными связями, отсутствующими в линейных системах.

В-третьих, это периодические, колебательные явления. На всех уровнях организации — от макромолекулярного до популяционного — в биологических системах происходят незатухающие колебания характеристических параметров — ферментативной активности, концентраций метаболитов, численности популяции.

В-четвертых, биологическая система, начиная с клетки и кончая биосферой в целом, необратимо развивается, эволюционирует. Развитие всегда означает возникновение новых структур, создание новой информации, т. е. существенно нелинейные процессы.

Термодинамическая основа самоорганизации в открытой системе состоит в оттоке энтропии в окружающую среду. Этим определяются и онтогенез, и эволюция. Синергетика есть область физики, изучающая такого рода процессы самоорганизации, с которыми мы встречаемся и в космологии (образование галактик, звезд и планет), и в физике атмосферы (скажем, образование периодических перистых облаков, образование смерчей и т. д.), и в химии (реакции Белоусова — Жаботинского, см. далее), и во всем разнообразии биологических явлений. Можно сказать, что первыми выдающимися трудами в области синергетики были теория происхождения Солнечной системы Канта и Лапласа и эволюционная теория Дарвина. В «Происхождении видов» показано, как из совершенно неупорядоченной случайной изменчивости возникает упорядоченное развитие биосферы — происходит самоорганизация.

При исследовании таких процессов необходимо, очевидно, рассмотрение множественных устойчивых и неустойчивых стационарных состояний диссипативных систем и переходов между ни-

ми. В сущности термодинамика как таковая здесь кончается — описание нелинейных систем на ее основе недостаточно. Термодинамика позволяет лишь сформулировать критерии устойчивости. Для дальнейшего рассмотрения самоорганизующихся систем необходимо физико-математическое моделирование, построение динамических моделей.

Такое моделирование проводится с помощью аппарата дифференциальных уравнений. Вопрос о применимости этого аппарата к биологическим системам не тривиален.

«Химическая машина», вообще говоря, характеризуется не непрерывным, но дискретным набором состояний. Применение аппарата дифференциальных уравнений к такой системе означает включение дискретных состояний в некоторое непрерывное множество. Такая процедура не препятствует трактовке поведения дискретной системы, напротив, при надлежащем выборе модели она позволяет его проанализировать. Вместе с тем аппарат детерминистических, континуальных дифференциальных уравнений может оказаться недостаточным для исследования процессов, протекающих с участием малого числа молекул или малого числа особей. Такие процессы являются *стохастическими*, вероятностными, их анализ требует применения теории вероятности, в ряде случаев — *теории цепей Маркова*. Вопрос о математическом аппарате должен решаться отдельно для каждого класса моделей. Само моделирование определяется изучаемым процессом и непосредственно зависит от шкалы времени, в которой он развивается. В любой биологической системе происходит множество нелинейных кинетических процессов, характеризуемых собственными временами.

В этой и следующих главах мы рассмотрим различные модели биологических процессов. Основным методом является исследование дифференциальных уравнений, описывающих динамику модели, но в ряде случаев такое исследование должно быть дополнено решением соответствующих стохастических задач.

§ 15.2. Физико-математические основы динамики нелинейных процессов

Определим метод изучения биологической системы как построение динамической модели и ее описание дифференциальными уравнениями, т. е. как построение системы уравнений и исследование их решений.

Достаточно общая форма математической модели имеет вид

$$\begin{aligned} \frac{dx_1}{dt} &= \mathcal{F}_1(x_1, \ldots, x_N), \\ &\cdots\cdots\cdots\cdots \\ \frac{dx_N}{dt} &= \mathcal{F}_N(x_1, \ldots, x_N), \end{aligned} \tag{15.6}$$

где $x_1, \ldots, x_N$ — физические переменные, характеризующие си-

стему, зависящие от времени и начальных условий, $\mathscr{F}_1, \ldots, \mathscr{F}_N$ — в общем случае нелинейные функции этих переменных. Так, величины x_i могут выражать концентрации метаболитов или числа особей.

Обычный метод исследования нелинейных уравнений типа (15.6) состоит в их линеаризации. Ищутся стационарные значения переменных $x_1^0, x_2^0, \ldots, x_N^0$, являющиеся решениями уравнений (15.6) при $\dot{x}_1 = \ldots = \dot{x}_N = 0$. Далее исследуются линейные уравнения, записанные в переменных, представляющих малые отклонения от стационарных значений $x_i - x_i^0$. При этом можно пренебречь членами второго порядка малости, нелинейными относительно $x_i - x_i^0$.

Начнем изложение с исследования простой линейной модели — осциллятора с трением. Уравнение движения имеет вид

$$m\ddot{x} + b\dot{x} + kx = 0. \tag{15.7}$$

Оно содержит лишь одну переменную — отклонение от положения равновесия x. Однако мы можем перейти к системе двух уравнений типа (15.6), введя вторую переменную — скорость $y = \dot{x}$. Имеем

$$\dot{x} = y, \quad \dot{y} = -\frac{b}{m} y - \frac{k}{m} x. \tag{15.8}$$

Оба уравнения линейны, как и исходное (15.7). Его решение имеет вид

$$x = A_1 \exp(\lambda_1 t) + A_2 \exp(\lambda_2 t), \tag{15.9}$$

где λ_1 и λ_2 — корни квадратного уравнения (см. далее с. 490)

$$\lambda^2 + \frac{b}{m}\lambda + \frac{k}{m} = 0. \tag{15.10}$$

При $b^2 > 4km$ эти корни действительны, при $b^2 < 4km$ — комплексны. В первом случае процесс имеет характер апериодического затухания, во втором — затухающих колебаний. Значения A_1 и A_2 определяются начальными условиями.

Рациональный метод исследования динамической системы состоит в получении ее «*фазового портрета*». Поведение системы представляется движением изображающей точки на фазовой плоскости x, y, где $y = \dot{x}$. Если число переменных больше двух, то речь идет уже не о фазовой плоскости, но о фазовом пространстве. Во многих случаях, однако, оказывается возможным ограничиться системами второго порядка типа (15.8), т. е. $N = 2$.

На фазовой плоскости точка движется по фазовой траектории с фазовой скоростью. Уравнение фазовой траектории для осциллятора с трением получим, исключив время из уравнений (15.8). Для этого разделим второе уравнение на первое:

$$\frac{dy}{dx} = -\frac{2hy + \omega_0^2 x}{y}, \tag{15.11}$$

где $2h = b/m$, $\omega_0^2 = k/m$. Это уравнение описывает интегральные кривые, в каждой точке которых касательная имеет наклон, равный dy/dx. Вместе с (15.8) уравнение (15.11) определяет на фазовой плоскости некоторое векторное поле с единственной особой точкой $x = 0$, $y = 0$. Удобно исследовать это поле с помощью *изоклин*, т. е. кривых (в данном случае прямых), являющихся геометрическим местом точек, в которых касательные ко всем интегральным кривым имеют одинаковый наклон. В случае осциллятора уравнение изоклины с наклоном $\varkappa$ имеет вид

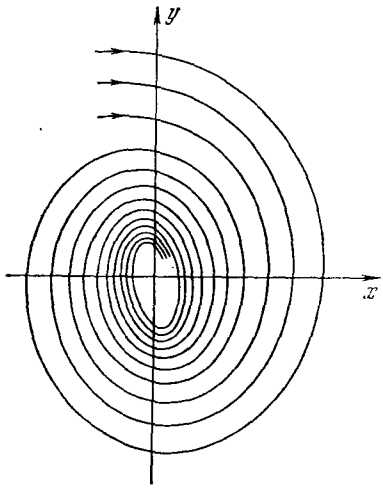


Рис. 15.2. Интегральные кривые на фазовой плоскости для затухающих колебаний осциллятора с трением

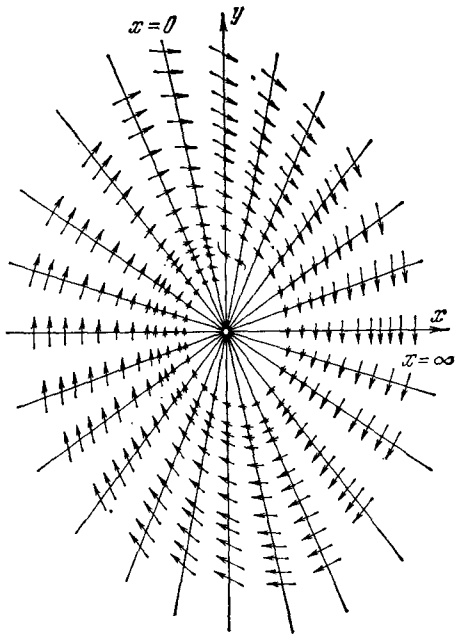


Рис. 15.3. Векторное поле для осциллятора с трением

$$dy/dx = \varkappa$$

или

$$y = ax = -\frac{\omega_0^2}{\varkappa + 2h}\,x. \qquad (15.12)$$

Таким образом, изоклины представляют собой прямые, проходящие через начало координат — через особую точку $x = 0$, $y = 0$.

Решение уравнения (15.11) при $b^2 < 4k/m$ или $h^2 < \omega_0^2$ имеет вид координатного уравнения

$$y^2 + 2hxy + \omega_0^2 x^2 = C \exp\left(2\frac{h}{\omega_0}\operatorname{arctg}\frac{y + hx}{\omega_0 x}\right), \qquad (15.13)$$

где C — постоянная, определяемая начальными условиями. Этому решению соответствует семейство логарифмических спиралей,

показанное на рис. 15.2. Векторное поле, построенное с помощью изоклин, изображено на рис. 15.3.

Фазовая скорость находится из следующего уравнения:

$$\mathbf{v} = \mathbf{i}\dot{x} + \mathbf{j}\dot{y}, \tag{15.14}$$

где $\mathbf{i}$ и $\mathbf{j}$ — единичные векторы. В нашем случае из уравнений (15.8) следует

$$\mathbf{v} = \mathbf{i}y + \mathbf{j}\left(-2hy - \omega_0^2 x\right)$$

и

$$|\mathbf{v}|^2 = \dot{x}^2 + \dot{y}^2 = \omega_0^4 x^2 + 4h\omega_0^2 xy + (1 + 4h^2)\, y^2.$$

Фазовая скорость убывает по мере приближения к началу координат и обращается в нуль в этой точке.

При $h = 0$, т. е. $b = 0$, трения нет, система становится незатухающим гармоническим осциллятором. Интегральные кривые представляют семейство эллипсов

$$y^2 + \omega_0^2 x^2 = \text{const}. \tag{15.15}$$

Уравнение изоклин имеет вид $y = -\omega_0^2 x/\varkappa$, фазовая скорость $\mathbf{v} = \mathbf{i}y - \mathbf{j}\omega_0^2 x$.

Для затухающего апериодического процесса $b^2 > 4k/m$, т. е. $h^2 > \omega_0^2$. Корни характеристического уравнения

$$\lambda_{1,2} = -h \pm \sqrt{h^2 - \omega_0^2}.$$

Фазовый портрет системы показан на рис. 15.4.

В описанных примерах мы имеем дело с различными типами особых точек, во всех трех случаях расположенных в начале координат. Для гармонического осциллятора без трения все фазовые кривые замкнуты, имеют форму эллипса. Они охватывают особую точку, называемую *центром*. Для затухающих колебаний особая точка является асимптотической точкой всех кривых, имеющих вид вложенных друг в друга спиралей. Такая точка называется *фокусом*. Наконец, при апериодическом затухании все кривые проходят через особую точку, именуемую *узлом*.

Проведем общее исследование особых точек для системы второго порядка. Имеем два нелинейных дифференциальных уравнения:

$$\begin{aligned} \dot{x} &= a_1 x + a_2 y + X_2(x, y), \\ \dot{y} &= b_1 x + b_2 y + Y_2(x, y), \end{aligned} \tag{15.16}$$

где X_2, Y_2 — полиномы, содержащие члены порядка выше первого относительно x и y. Правые части уравнений обращаются в нуль в начале координат $x = 0$, $y = 0$. Следовательно, это особая точка, отвечающая стационарному состоянию $\dot{x} = 0$, $\dot{y} = 0$. Ограничиваясь линейным приближением, т. е. рассматривая лишь окрестность этой точки, имеем

$$\dot{x} = a_1 x + a_2 y, \quad \dot{y} = b_1 x + b_2 y. \tag{15.17}$$

Интегральная кривая есть

$$\frac{dy}{dx} = \frac{b_1 x + b_2 y}{a_1 x + a_2 y}. \tag{15.18}$$

Ищем решения уравнений (15.17) в виде

$$x = A\exp(\lambda t), \quad y = B\exp(\lambda t).$$

Подставляем эти решения в (15.17). Получаем два однородных уравнения относительно x и y. Условие их совместности имеет вид

$$\begin{vmatrix} a_1 - \lambda & a_2 \\ b_1 & b_2 - \lambda \end{vmatrix} = 0$$

или

$$\lambda^2 - (a_1 + b_2)\lambda + a_1 b_2 - a_2 b_1 = 0. \tag{15.19}$$

Так как это квадратное уравнение имеет два корня, λ_1 и λ_2, и система уравнений (15.17) линейна, полное ее решение имеет вид

$$x = A_1\exp(\lambda_1 t) + A_2\exp(\lambda_2 t),$$
$$y = B_1\exp(\lambda_1 t) + B_2\exp(\lambda_2 t).$$

Значения A_1, A_2, B_1, B_2 определяются начальными условиями, т. е. величинами x, y, $\dot{x}$, $\dot{y}$ при $t = 0$.

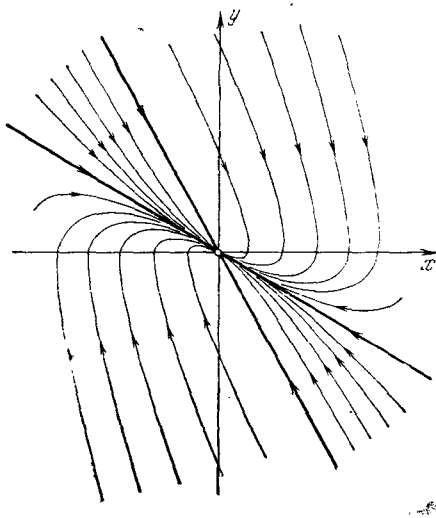


Рис. 15.4. Интегральные кривые для апериодического затухания осциллятора с трением

В случае осциллятора с трением $a_1 = 0$, $a_2 = 1$, $b_1 = -\omega_0^2$, $b_2 = -2h$.

Общая классификация особых точек, данная Пуанкаре, основывается на поведении интегральных кривых в ближайшей окрестности этих точек.

Если дискриминант характеристического уравнения $D = -(a_1 - b_2)^2 - 4a_2 b_1 \leqslant 0$, то оба корня λ_1, λ_2 действительны. Если при этом $a_1 b_2 - a_2 b_1 > 0$, то их знаки одинаковы. Имеем следующие случаи:

1. λ_1, $\lambda_2 < 0$. Решение имеет вид убывающих со временем экспонент, т. е. система, выведенная из особой точки, в нее возвращается. Особая точка есть *устойчивый узел.*

2. λ_1, $\lambda_2 > 0$. Система удаляется от особой точки, являющейся *неустойчивым узлом.*

3. Если $D \leqslant 0$ и $a_1 b_2 - a_2 b_1 < 0$, то корни λ_1, λ_2 имеют разные знаки. Особая точка является неустойчивой и именуется *седлом.* Через нее проходят две интегральные кривые, называемые *сепа-*

ратрисами. Остальные фазовые траектории уходят в бесконечность, минуя особую точку.

4. Если $D<0$, но $a_1b_2-a_2b_1=0$, т. е. $D=-(a_1+b_2)^2$, то $\lambda_1=0$, $\lambda_2=a_1+b_2$. Один из корней равен нулю. Для линейной системы (15.17) получается не особая точка, но прямая, соответствующая стационарным состояниям, в которую упираются остальные интегральные прямые, направление движения по ним зависит от знака λ_2.

Если дискриминант $D>0$, то корни λ_1, λ_2 комплексно-сопряженные.

5. Действительные части λ_1, λ_2 отрицательны, т. е. $a_1+b_2<0$. В системе происходят затухающие колебания; особая точка, на которую накручиваются спиральные фазовые траектории, есть *устойчивый фокус.*

6. Действительные части λ_1, λ_2 положительны, т. е. $a_1+b_2>0$. Особая точка есть *неустойчивый фокус*, соответствующий колебаниям, нарастающим по амплитуде.

7. Корни $\lambda_1=-\lambda_2$ мнимые, т. е. $a_1+b_2=0$. В системе происходят незатухающие колебания, особая точка есть *центр.* Фазовые траектории колебаний представляют собой концентрические эллипсы.

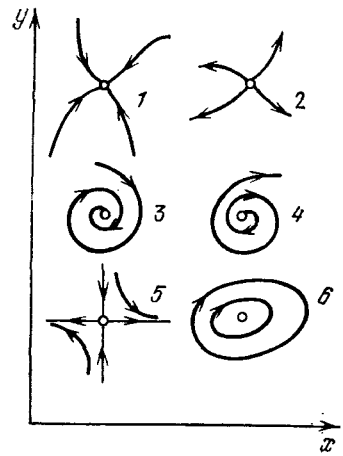


Рис. 15.5. Типы особых точек: *1* — устойчивый узел, *2* — неустойчивый узел, *3* — устойчивый фокус, *4* — неустойчивый фокус, *5* — седло, *6* — центр

Виды особых точек показаны на рис. 15.5.

Особая точка изображает устойчивое или неустойчивое равновесие или стационарное состояние. Определение устойчивости состояния равновесия (применимое и к стационарному состоянию) по Ляпунову гласит:

«Состояние равновесия устойчиво, если для любой заданной области ε допустимых отклонений от состояния равновесия имеется область $\delta(\varepsilon)$, окружающая это состояние и обладающая тем свойством, что ни одно движение, начинающееся внутри δ, никогда не достигает границы области ε». И наоборот, состояние равновесия неустойчиво, если имеется область ε, для которой область $\delta(\varepsilon)$ не существует. Пусть на фазовой плоскости область ε есть квадрат; тогда состояние $x=x_0$, $y=y_0$ устойчиво, если, задав наперед сколь угодно малое положительное значение ε, можно найти такое $\delta(\varepsilon)$, что если при $t=0$

$$|x(0)-x_0|<\delta \quad \text{и} \quad |y(0)-y_0|<\delta,$$

то при $t\to\infty$

$$|x(t)-x_0|<\varepsilon \quad \text{и} \quad |y(t)-y_0|<\varepsilon.$$

Именно с такого типа устойчивостью и неустойчивостью мы имеем дело.

Излагаемая здесь теория нелинейных динамических систем развита школами Мандельштама и Андронова.

Теория нелинейных динамических систем различает «*грубые*» и «*негрубые*» системы. В первом случае малые изменения параметров системы не изменяют ее общего поведения — математическая модель устойчива по отношению к малым изменениям вида дифференциальных уравнений. Ситуации, отвечающие пунктам 1, 2, 3, 5, 6 приведенной выше классификации, характеризуют грубые системы. Напротив, в случаях 4 и 7 системы негрубые. В самом деле, в случае 4 значение параметра $a_1b_2 - a_2b_1 = 0$ является критическим, при переходе от положительного к отрицательному значению параметра вместо устойчивого узла возникает седло. В случае 7 критическим является значение $a_1 + b_2 = 0$ — при переходе $a_1 + b_2 > 0 \to a_1 + b_2 = 0 \to a_1 + b_2 < 0$ особые точки изменяют свой характер: неустойчивый фокус → центр → устойчивый фокус.

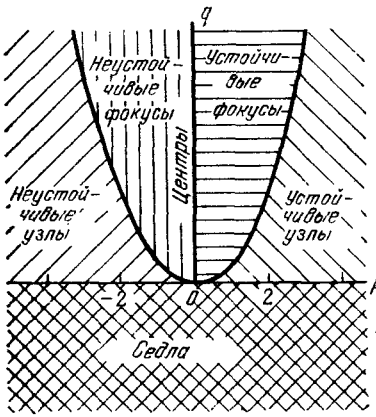


Рис. 15.6. Области особых точек

Значения параметров системы, при которых она меняет свое поведение, называются критическими или точками *бифуркации*.

Вернемся к характеристическому уравнению системы с двумя степенями свободы (15.19). Перепишем его в виде

$$\lambda^2 + p\lambda + q = 0. \qquad (15.19а)$$

Коэффициенты p, q являются функциями параметров системы — в рассмотренном случае параметров a_1, a_2, b_1, b_2. Области различных особых точек удобно представить на плоскости p, q (рис. 15.6). Корни λ_1, λ_2 имеют отрицательную действительную часть только при $p > 0$, $q > 0$. Комплексные корни, соответствующие фокусам, находятся только в области $q > p^2/4$, т. е. между ветвями параболы $q = p^2/4$, а область $q < p^2/4$ соответствует узлам. Центры располагаются на положительной стороне оси ординат — при $p = 0$, $q > 0$. При изменении параметров системы изображающая точка может пересечь границу области. В этом случае происходит *бифуркация*.

Специальные случаи критических точек, отвечающих различным типам структурных неустойчивостей, рассматриваются в так называемой «*теории катастроф*» Тома. Мы здесь не останавливаемся на этой теории, но ее применение к некоторым специальным задачам биофизики представляется обещающим.

Среди рассмотренных линейных систем только гармонический осциллятор без трения имеет замкнутые фазовые траектории, отвечающие периодическому движению. В такой системе энергия постоянна, система консервативна. Периодические процессы в линейных неконсервативных системах невозможны.

Колебательное поведение нелинейных систем весьма сложно и разнообразно. Его изучение имеет фундаментальное значение для очень широкого круга физических проблем, в том числе для проблем биофизики.

Общие уравнения (15.6) нелинейны, то же относится к уравнениям (15.16), которые мы линеаризовали с целью исследования окрестностей особых точек. Такое исследование не отвечает, однако, на вопросы о поведении нелинейной системы на всей фазовой плоскости. Мы встретимся с нелинейными системами, характеризуемыми множественными особыми точками, в дальнейшем изложении.

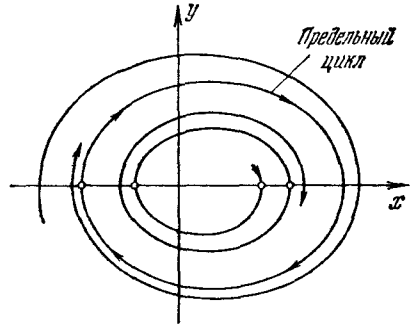


Рис. 15.7. Предельный цикл

Особый интерес для биологии представляют нелинейные *автоколебательные системы*, в которых устанавливаются и поддерживаются незатухающие колебания, несмотря на наличие трения. Это происходит за счет сил, зависящих от состояния движения самой системы. Размах автоколебаний определяется свойствами системы, а не начальными условиями. Из неустойчивых особых точек фазовые траектории уходят в бесконечность или к устойчивым точкам. Но в случае автоколебаний эти траектории «накручиваются» на замкнутую кривую, охватывающую особую точку — на *предельный цикл* (рис. 15.7). В свою очередь, предельные циклы могут быть и неустойчивыми. Эти ситуации присущи грубым системам, к которым относится, по-видимому, ряд биологических систем. Устойчивый предельный цикл, изображенный на рис. 15.7, соответствует незатухающим автоколебаниям. С таким явлением мы уже встречались при обсуждении свойств летательных мышц насекомых.

Особенности интересующих нас химических и биологических динамических систем состоят в следующем.

1. Динамическими переменными в химии и в ряде биологических проблем являются концентрации реагентов. На той же основе в качестве переменных рассматриваются числа организмов (в популяционной генетике и экологии).

2. В химико-биологической системе химические процессы связаны с диффузионными, с транспортом вещества. Иными словами, здесь мы встречаемся не с точечными, а с *распределенными системами*. Особое значение для биологии имеет *компартмента-*

ция — подразделение системы на «отсеки», разделенные мембранами. Система гетерогенна не только химически, но и пространственно.

3. В химических системах живой природы нелинейные химические реакции сопряжены как с транспортом вещества, так и с механическими и электрическими процессами.

4. Во многих химико-биологических процессах приходится иметь дело с малыми числами молекул. Само понятие концентрации имеет в этих случаях ограниченную применимость, и в качестве динамических переменных следует вводить вероятности тех или иных состояний молекул.

Математические модели биологических процесеов зачастую весьма сложны, содержат много переменных и описывают многостадийное поведение. Имеются, однако, возможности упрощенного рассмотрения, состоящего в сведении большой совокупности уравнений к двум-трем нелинейным уравнениям.

Пусть нам удалось после ряда преобразований и выбора соответствующих масштабов расположить систему нелинейных уравнений (15.6) по степеням малого параметра $\varepsilon \ll 1$ при производной

$$\begin{aligned} \varepsilon^2 \dot{x}_i &= \mathcal{F}_i(x_1, \ldots, x_N), \quad i = 1, 2, \ldots, l, \\ \varepsilon \dot{x}_j &= \mathcal{F}_j(x_1, \ldots, x_N), \quad j = l+1, \ldots, l+m, \\ \dot{x}_k &= \mathcal{F}_k(x_1, \ldots, x_N), \quad k = l+m+1, \ldots, N. \end{aligned} \tag{15.20}$$

Коэффициенты ε^2 и ε определяют скорости изменений переменных x. В самом деле, систему (15.20) можно переписать в виде

$$\dot{x}_i = \tau_1^{-1} \mathcal{F}_i, \quad \dot{x}_j = \tau_2^{-1} \mathcal{F}_j, \quad \dot{x}_k = \tau_3^{-1} \mathcal{F}_k,$$

где $\tau_1 = \varepsilon^2$, $\tau_2 = \varepsilon$, $\tau_3 = 1$, т. е. $\tau_1 \ll \tau_2 \ll \tau_3$. Если существенно поведение системы как на малых отрезках времени порядка τ_1, так и на больших порядка τ_3, то приходится изучать систему в целом. В других случаях ситуация иная. Так, если важны явления, происходящие за средние времена порядка τ_2, то система упрощается. В самом деле, за эти времена «медленные» переменные x_k не успевают измениться, и можно заменить их начальными постоянными значениями. Напротив, «быстрые» переменные x_i успевают достичь своих стационарных значений, если таковые существуют. Значит, переменные x_i можно заменить их стационарными значениями. Таким образом, из N уравнений остаются лишь m уравнений. Мы не раз воспользуемся таким способом упрощения в последующем изложении.

§ 15.3. Модели Лотка и Вольтерра

Физико-математическое моделирование биологических процессов началось с модели автокаталитической химической реакции, предложенной Лотка (1920), и модели «*хищник — жертва*», предложенной Вольтерра (1930). Эти модели имеют много общего.

Они являются одними из простейших моделей, описывающих поведение нелинейных систем, и в то же время существенны для ряда химических и биологических проблем. Мы начнем с рассмотрения этих моделей, дающих необходимые нам примеры нелинейной динамики.

Лотка рассмотрел систему реакций

$$A \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} X, \qquad (I)$$

$$X + Y \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} 2Y, \qquad (II)$$

$$Y \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftarrows}} E. \qquad (III)$$

Суммарная реакция есть $A \rightleftarrows E$. Стадия (II) автокаталитическая. Вещество A находится в избытке, поэтому реакция (I) нулевого порядка.

Общее сродство, отвечающее суммарной реакции (ср. с. 310),

$$\mathcal{A} = \mathcal{A}_I + \mathcal{A}_{II} + \mathcal{A}_{III} = RT \ln \frac{k_1 k_2 k_3 [A]}{k_{-1} k_{-2} k_{-3} [E]}. \qquad (15.21)$$

Вблизи равновесия система линейна:

$$v_I^0 = k_1 \frac{\mathcal{A}_I}{RT}, \quad v_{II}^0 = k_2 X_{eq} Y_{eq} \frac{\mathcal{A}_{II}}{RT}, \quad v_{III}^0 = k_3 Y_{eq} \frac{\mathcal{A}_{III}}{RT}. \qquad (15.22)$$

Условие устойчивости имеет вид

$$k_1 (\delta \mathcal{A}_I)^2 + k_2 X_{eq} Y_{eq} (\delta \mathcal{A}_{II})^2 + k_3 Y_{eq} (\delta \mathcal{A}_{III})^2 \geqslant 0. \qquad (15.23)$$

Вблизи равновесия оно соблюдается (ср. с. 321). Вдали от равновесия можно пренебречь обратными реакциями, т. е. положить $k_{-1} = k_{-2} = k_{-3} = 0$. Следовательно, $\mathcal{A} \to \infty$. Кинетические уравнения нелинейны и асимметричны:

$$\dot{X} = k_1 - k_2 XY, \quad \dot{Y} = k_2 XY - k_3 Y, \quad \dot{E} = k_3 Y. \qquad (15.24)$$

Единственное стационарное решение отвечает условию $\dot{X} = \dot{Y} = 0$. Имеем

$$X^0 = k_3/k_2, \quad Y^0 = k_1/k_3.$$

Как поведет себя система вдали от равновесия? Рассмотрим это на основе модели «хищник — жертва», исследованной Вольтерра.

В некотором замкнутом районе живут хищники и их жертвы, скажем, рыси и зайцы. Рыси питаются только зайцами, зайцы питаются растительной пищей, имеющейся в избытке. Число жертв X, число хищников Y. Поведение популяций во времени описывается уравнениями

$$\dot{X} = k_1 X - kXY, \quad \dot{Y} = k' XY - k_2 Y. \qquad (15.25)$$

Константа k_1 характеризует размножение жертв, k — их убыль вследствие встреч с хищниками, k' — размножение хищников, для которого необходимо питание хищников, т. е. встречи с жертвами, k_2 — вымирание хищников. Уравнения (15.25) в основных чертах сходны с уравнениями (15.24). Найдем стационарные значения переменных из уравнений (15.25) при $\dot{X} = \dot{Y} = 0$:

$$X^0 = k_2/k', \quad Y^0 = k_1/k.$$

Представим X и Y в виде

$$X = X^0 e^{\alpha}, \quad Y = Y^0 e^{\beta}, \tag{15.26}$$

где $\alpha = \ln(X/X^0)$ и $\beta = \ln(Y/Y^0)$ являются мерами отклонения X и Y от стационарного состояния, в котором $\alpha = \beta = 0$. Уравнения (15.25) перепишутся в виде

$$\frac{1}{k}\dot{\alpha} = Y^0(1 - e^{\beta}), \quad \frac{1}{k'}\dot{\beta} = -X^0(1 - e^{\alpha}). \tag{15.27}$$

Умножим первое уравнение на $X^0(1 - e^{\alpha})$, второе — на $Y^0(1 - e^{\beta})$ и сложим:

$$\frac{1}{k}X^0\dot{\alpha}(1 - e^{\alpha}) + \frac{1}{k'}Y^0\dot{\beta}(1 - e^{\beta}) = 0$$

или

$$\frac{d}{dt}\left[\frac{1}{k}X^0(e^{\alpha} - \alpha) + \frac{1}{k'}Y^0(e^{\beta} - \beta)\right] = 0,$$

т. е.

$$\frac{1}{k}X^0(e^{\alpha} - \alpha) + \frac{1}{k'}Y^0(e^{\beta} - \beta) = K = \text{const}. \tag{15.28}$$

Величина K есть постоянная движения. Оба члена в K положительны, так как если $\alpha > 0$, то $e^{\alpha} > \alpha$, а если $\alpha < 0$, то $e^{\alpha} > 0$.

Введем обозначения $e^{\alpha} = \varphi$, $e^{\beta} = \psi$. Умножив обе части (15.28) на kk', имеем, так как $k'X^0 = k_2$, $kY^0 = k_1$,

$$k_2(\varphi - \ln\varphi) + k_1(\psi - \ln\psi) = Kkk' = \text{const}.$$

Поделив на k_1k_2, находим

$$\frac{1}{k_1}(\varphi - \ln\varphi) + \frac{1}{k_2}(\psi - \ln\psi) = K\frac{kk'}{k_1k_2} = \text{const}.$$

Потенцируем:

$$(\varphi e^{-\varphi})^{1/k_1}(\psi e^{-\psi})^{1/k_2} \equiv UV = \text{const}. \tag{15.29}$$

Уравнение $UV = \text{const}$ есть уравнение гиперболы. Ее график показан на рис. 15.8, *а*. На рис. 15.8, *б* и *в* показано поведение функций $V(\psi)$ и $U(\varphi)$. Эти кривые имеют максимумы. Зависимость φ от ψ, следующая из (15.29), показана на рис. 15.8, *г*. Максимумам U и V отвечают точки A и B на гиперболе. При движении между этими двумя предельными точками на плоскости φ, ψ описывается цикл, вид которого зависит от начальных условий. Стационарному состоянию отвечают точки A и B на ги-

перболе, точки максимумов M_1 и M_2 на кривых $U(\varphi)$ и $V(\psi)$ и особая точка типа центра на плоскости φ, ψ.

Определим поведение системы вблизи особой точки. Линеаризуем систему (15.25) — ищем ее решение в виде

$$X = X^0 + xe^{\lambda t}, \quad Y = Y^0 + ye^{\lambda t}, \tag{15.30}$$

причем $|x|, |y| \ll X^0, Y^0$. Пренебрегая членами, нелинейными относительно x, y, получаем

$$\lambda x + \frac{kk_2}{k'} y = 0, \quad -\frac{k'k_1}{k} x + \lambda y = 0. \tag{15.31}$$

Условие совместности этих двух уравнений есть характеристическое уравнение

$$\lambda^2 + k_1 k_2 = 0 \tag{15.32}$$

и $\lambda = i\omega$ — мнимая величина. Частота колебаний равна

$$\nu = \frac{\omega}{2\pi} = \frac{1}{2\pi}\sqrt{k_1 k_2}. \tag{15.33}$$

Она не зависит от констант k, k'. Напротив, амплитуды колеба-

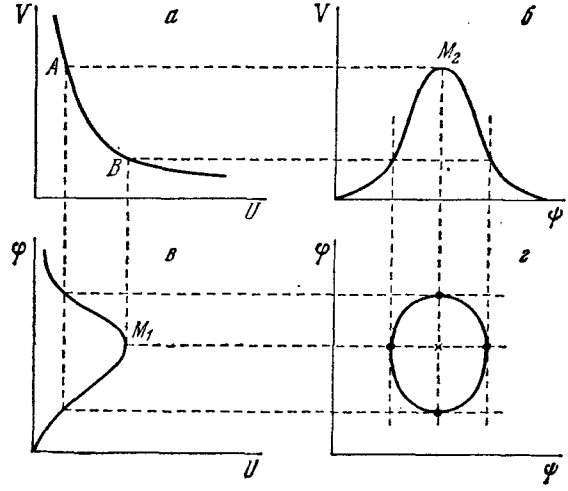


Рис. 15.8. Построение интегральных кривых для модели Вольтерра — Лотка. Объяснение в тексте

ний зависят от всех четырех констант. Из (15.31) и (15.32) следует

$$\frac{|x|}{|y|} = \frac{k}{k'}\sqrt{\frac{k_2}{k_1}}. \tag{15.34}$$

Таким образом, популяции X и Y испытывают периодические колебания одинаковой частоты, смещенные по фазе. Для сравнения приведем рис. 15.9, на котором показана динамика популя-

ций зайцев и рысей в Канаде за 1845—1935 гг. по данным меховой компании. Такое поведение следует и из наглядных соображений. Допустим, что зайцев вначале было много. Тогда рыси размножились, и число зайцев уменьшилось. Это, в свою очередь, вызвало уменьшение числа зайцев, за ним последовало

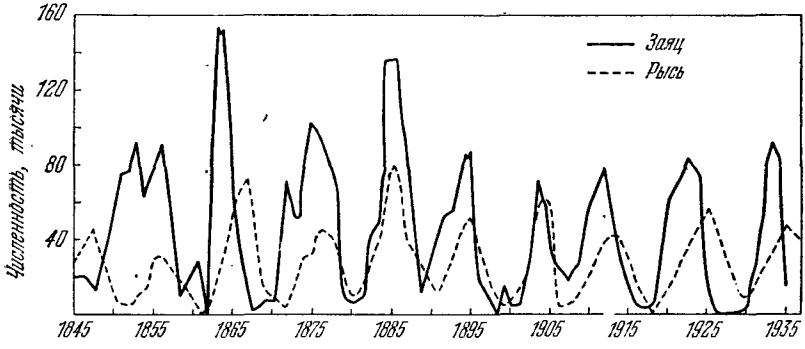


Рис. 15.9. Динамика популяций зайцев и рысей в Канаде за 1845—1935 гг.

уменьшение числа рысей, зайцы вновь размножились и т. д. В простых случаях результаты применения математической модели качественно очевидны. Однако без анализа нельзя установить ни частоты, ни амплитуды колебаний X и Y. В более сложных случаях математическая модель раскрывает особенности, заранее вовсе не очевидные.

Мы исследовали поведение консервативной системы. В действительности популяции видов могут расти лишь до некоторого предела, до значений $X^{(m)}$, $Y^{(m)}$, отвечающих насыщению. Предел размножения жертв выражается соотношением (Ферхулст)

$$\dot{X} = k_1 X \frac{X^{(m)} - X}{X^{(m)}} - kXY. \tag{15.35}$$

По-прежнему

$$\dot{Y} = k'XY - k_2 Y. \tag{15.36}$$

Система (15.35), (15.36) более не консервативна и не имеет постоянной движения.

Уравнения типа (15.25) обобщаются на любое число взаимодействующих популяций. Исследование соответствующих систем важно для экологии.

Уравнения автокатализа Лотка, сходные с уравнениями Вольтерра, также приводят к периодическому поведению. Мы видим, что нелинейные асимметрические системы способны к поведению, упорядоченному во времени.

Мы видели, что для химических процессов

$$d_{\underline{X}}\sigma = \frac{1}{T}\sum_i v_i d\mathcal{A}_i \leqslant 0 \tag{15.37}$$

(ср. (15.3)). Вблизи стационарного состояния

$$T\delta_X\sigma = \sum_i \delta v_i d(\delta \mathscr{A}_i) \leqslant 0. \tag{15.38}$$

Разлагая δv_i в ряд по $\delta \mathscr{A}_i$, получаем

$$\delta v_i = \sum_j L'_{ij} \delta \mathscr{A}_j, \tag{15.39}$$

где $L'_{ij} = (\partial v_i/\partial \mathscr{A}_j)_0$ — производные, взятые для стационарного состояния. Вообще говоря, L'_{ij} может содержать как симметричную, так и антисимметричную часть. В условиях линейности, т. е. вблизи равновесия, коэффициенты L'_{ij} совпадают с коэффициентами Онзагера и антисимметричные их части равны нулю. Вдали от равновесия это также возможно. Тогда

$$Td_X\sigma = d\Psi \leqslant 0, \tag{15.40}$$

где

$$\Psi = {}^1/_2 \sum_{i,j} L'_{ij} \delta \mathscr{A}_i \delta \mathscr{A}_j \tag{15.41}$$

есть кинетический потенциал. Однако если антисимметричные части L'_{ij} отличны от нуля, то в общем случае кинетический потенциал не существует. Допустим, что два химических процесса описываются антисимметричной матрицей L'_{ij}, т. е.

$$L'_{11} = L'_{22} = 0, \quad L'_{12} = -L'_{21} = -L'.$$

Тогда

$$T\delta_X\sigma = L'(\delta \mathscr{A}_2 d(\delta \mathscr{A}_1) - \delta \mathscr{A}_1 d(\delta \mathscr{A}_2)) \leqslant 0. \tag{15.42}$$

Такая система вращается вокруг стационарного состояния, не попадая в него. Фазовая диаграмма имеет вид, показанный на рис. 15.10; точка, отвечающая стационарному состоянию, есть центр. Вводя полярные координаты r и φ на плоскости $\mathscr{A}_1$, $\mathscr{A}_2$, имеем

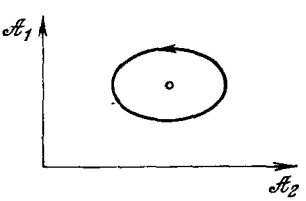


Рис. 15.10. Обращение вокруг стационарного состояния антисимметричной системы

$$Td_X\sigma = -L'r^2 d\varphi \leqslant 0. \tag{15.43}$$

Но функция $\Psi = L'r^2\varphi$ не является потенциалом — она возрастает на $2\pi L'r^2$ при каждом обороте.

Именно с такой ситуацией мы встретились при рассмотрении системы Лотка — Вольтерра.

§ 15.4. Автокаталитические системы

Рассмотренная нами химическая автокаталитическая система Лотка является колебательной, она характеризуется особой точкой типа центра. Обратимся к другим, более сложным точечным автокаталитическим химическим системам. Исследуем так назы-

ваемый «*брюсселятор*» — модель Пригожина, Лефевра и Николиса.

Имеем четыре сопряженных реакции:

$$A \xrightarrow{k_1} X, \tag{I}$$

$$2X + Y \xrightarrow{k_2} 3X, \tag{II}$$

$$B + X \xrightarrow{k_3} D + Y, \tag{III}$$

$$X \xrightarrow{k_4} E. \tag{IV}$$

Суммарная реакция есть $A + B \to D + E$. Реакция (II) — автокаталитическая.

Кинетические уравнения для промежуточных веществ X и Y имеют вид

$$\begin{aligned} \dot{X} &= k_1 A + k_2 X^2 Y - k_3 B X - k_4 X, \\ \dot{Y} &= -k_2 X^2 Y + k_3 B X. \end{aligned} \tag{15.44}$$

Введем безразмерные переменные

$$\tau = k_4 t, \qquad x = X\sqrt{k_2/k_4}, \qquad y = Y\sqrt{k_2/k_4},$$

$$a = A(k_1/k_4)\sqrt{k_2/k_4}, \qquad b = Bk_3/k_4.$$

Получаем уравнения

$$\begin{aligned} dx/d\tau &= a + x^2 y - bx - x, \\ dy/d\tau &= -x^2 y + bx. \end{aligned} \tag{15.45}$$

Такие же уравнения получатся при $k_1 = k_2 = k_3 = k_4 = 1$ и $\tau = t$. Находим стационарное решение, приравняв левые части уравнений (15.45) нулю. Из второго уравнения находим $x_0^2 y_0 = bx_0$; подставляя в первое уравнение, получаем $x_0 = a$ и, следовательно, $y_0 = b/a$. Это решение единственное. Исследуем его устойчивость. Ищем решения (15.45) в виде

$$x = a + \alpha \exp(\lambda\tau), \qquad y = b/a + \beta \exp(\lambda\tau), \tag{15.46}$$

причем $|\alpha|, |\beta| \ll a, b/a$. В линейном приближении получаем

$$\alpha\lambda = (b-1)\alpha + a^2\beta, \qquad \beta\lambda = -b\alpha - a^2\beta$$

и характеристическое уравнение

$$\lambda^2 + (a^2 + 1 - b)\lambda + a^2 = 0, \tag{15.47}$$

имеющее корни

$$\lambda_{1,2} = -{}^1/_2(a^2 + 1 - b) \pm {}^1/_2\sqrt{(a^2 + 1 - b)^2 - 4a^2}. \tag{15.48}$$

Так как $\lambda_1\lambda_2 = a^2 > 0$, корни либо действительны и имеют одинаковые знаки, либо комплексно-сопряженные. Следовательно, мы имеем дело со случаями 1, 2 или 5, 6 классификации, приведенной на с. 490. Особая точка, отвечающая стационарному состоянию, есть устойчивый или неустойчивый узел или фокус. Система становится неустойчивой при переходе параметра b через значение, удовлетворяющее условию

$$p = a^2 + 1 - b = 0,$$

Значение $b_{кр} = a^2 + 1$ является критическим, бифуркационным. Парабола $b = a^2 + 1$ на плоскости a, b отделяет устойчивые области от неустойчивых: при $b > b_{кр} = a^2 + 1$ система имеет неустойчивые узлы или фокусы, при $b < b_{кр} = a^2 + 1$ — устойчивые узлы или фокусы. Самой параболе $b = a^2 + 1$ отвечают центры — при этом значении $\lambda_{1,2} = \pm ai$ и система выполняет незатухающие колебания. Кривые, отделяющие область фокусов от области узлов, находятся из условия равенства нулю корня квадратного в (15.48). Получаем

$$b = (a \pm 1)^2.$$

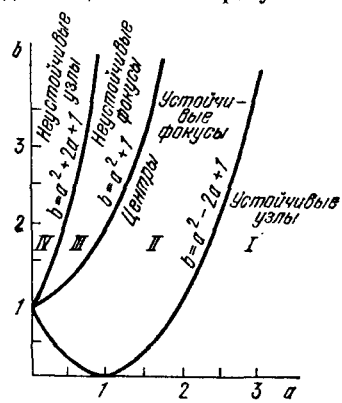


Рис. 15.11. Области на плоскости a, b

Таким образом, плоскость a, b разбивается на четыре области (рис. 15.11). В области *I* отклонения от стационарного состояния экспоненциально убывают, в области *IV* — экспоненциально растут. В области *II* происходят затухающие колебания, в области *III* — неустойчивые автоколебания. Экспоненциальный рост в области *IV* при большой амплитуде обрывается и периодически повторяется — возникает предельный цикл. Фазовая траектория брюсселятора при $a = 2$ и $b = 10$, т. е. в области *IV*, показана на рис. 15.12. Предельный цикл имеет форму, близкую к треугольной, автоколебания имеют острый релаксационный характер (рис. 15.13). Следует подчеркнуть, что предельный цикл не усматривается при исследовании линеаризованных уравнений — он возникает при достаточном отдалении от особой точки. Результаты, приведенные на рис. 15.12 и 15.13, получены численным интегрированием нелинейных уравнений.

«Брюсселятор» отличается от системы Лотка — Вольтерра. Последняя имеет бесконечное число возможных периодических движений, переходы между которыми осуществляются посредством изменений начальных условий и параметров. Напротив, «брюсселятор» — система неконсервативная, которая приходит к упорядоченному во времени когерентному режиму автоколебаний, независимо от начальных условий, если параметры системы отвечают области неустойчивых узлов.

Таким образом, точечные автокаталитические системы, примером которых является «брюсселятор», способны к переходу в состояние, упорядоченное во времени.

Обратимся теперь к *распределенным автокаталитическим системам.* Как мы увидим, вдали от равновесия такие системы могут образовывать пространственно упорядоченные диссипативные структуры. Распределение системы в пространстве определяется наличием диффузии.

Впервые проблема устойчивости по отношению к диффузии была исследована в работе Тьюринга (1952), имеющей примечательное название «О химической основе морфогенеза». Эта работа, а также исходящие из нее исследования ставят своей конечной целью модельное толкование биологических явлений, определяющих онтогенетическое развитие (см. гл. 17).

Дополним уравнения (15.45) членами, описывающими одномерную диффузию вдоль координаты r. Имеем

$$\frac{\partial x}{\partial \tau} = a + x^2 y - bx - x + D_x \frac{\partial^2 x}{\partial r^2},$$
$$\frac{\partial y}{\partial \tau} = -x^2 y + bx + D_y \frac{\partial^2 y}{\partial r^2}. \qquad (15.49)$$

Вещества x и y (т. е. X и Y) характеризуются разными константами одномерной диффузии D_x и D_y.

Ищем решения системы (15.49) в виде концентрационных волн (ср. (15.46)):

$$x = x_0 + \alpha \exp(\lambda\tau + ir/l),$$
$$y = y_0 + \beta \exp(\lambda\tau + ir/l). \qquad (15.50)$$

Здесь l есть длина волны, характеризующая пространственную неоднородность, $\alpha \ll x_0$, $\beta \ll y_0$, $x_0 = a$, $y_0 = b/a$. Подставляя (15.50) в (15.49), находим характеристическое уравнение

$$\lambda^2 + (a^2 + 1 - b + \xi + \eta)\lambda + a^2(1 + \xi) + (1 - b)\eta + \xi\eta = 0, \qquad (15.51)$$

где $\xi = D_x/l$, $\eta = D_y/l$. При $l \to \infty$ система становится гомогенной и уравнение (15.51) совпадает с (15.48).

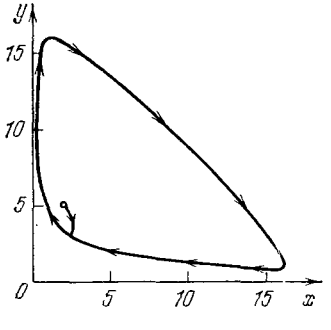


Рис. 15.12. Фазовая траектория брюсселятора

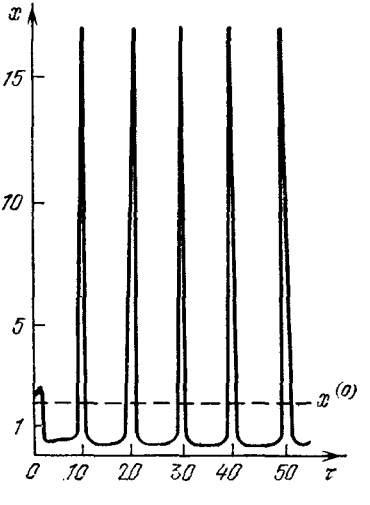


Рис. 15.13. Автоколебания брюсселятора

Уравнение (15.51) дает два типа неустойчивостей. Переход к первому типу соответствует равенству нулю множителя при λ и положительному значению суммы свободных членов:

$$b'_{кр} = 1 + a^2 + \xi + \eta.$$

Второй переход соответствует равенству нулю суммы свободных членов:

$$b''_{кр} = (a^2 + \eta)(1 + \xi)/\eta.$$

Во втором случае один из корней (15.51) обращается в нуль. Таким образом, решения устойчивы в области

$$b'_{\text{кр}} < b < b''_{\text{кр}}.$$

Условия неустойчивостей имеют вид

$$b > b''_{\text{кр}} \quad \text{и} \quad b < b''_{\text{кр}}.$$

Длина волны l, при которой $b'_{\text{кр}}$ минимальио, есть $l \to \infty$, ξ, $\eta \to 0$ и $\min b'_{\text{кр}} = 1 + a^2$. Мииимум $b''_{\text{кр}}$ находим, приравнивая производиую $b''_{\text{кр}}$ по l нулю. Получаем $l^2_{\text{кр}} = (D_x D_y)^{1/2}/a^{-1}$ и $\min b''_{\text{кр}} = \left[1 + a\,(D_x/D_y)^{1/2}\right]^2$. Неустойчивость возникает, когда b достигает меньшего из этих двух значений. Если $D_x = D_y$, то

$$\min b'_{\text{кр}} = 1 + a^2 < \min b''_{\text{кр}} = (1 + a)^2$$

и реализуется предельный цикл. Но при достаточно малых D_x/D_y $\min b'_{\text{кр}} > \min b''_{\text{кр}}$ — возникает пространственная неоднородиость т. е. происходит нарушение симметрии. Для b, большего $b_{\text{кр}}$, флуктуации

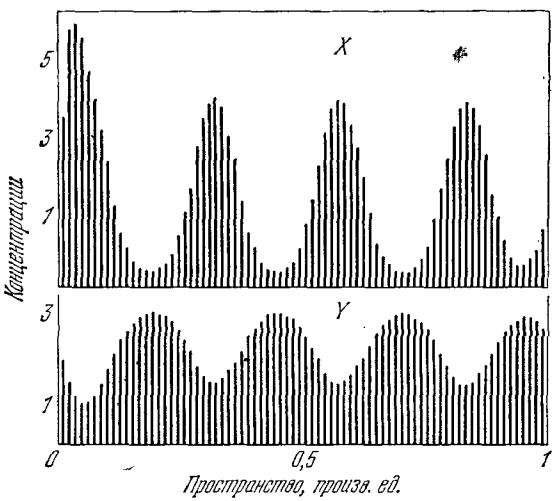


Рис. 15.14. Стационарное распределение вещества в результате нарушающей симметрию неустойчивости. Концентрации X, Y на границах области поддерживаются равными гомогенным стационарным значениям $X = 2$, $Y = 2{,}62$. Значения параметров: $a = 2{,}00$, $b = 5{,}24$, $D_x = 1{,}6 \cdot 16^3$, $D_y = 8 \cdot 10^{-3}$, т. е. $\min b'_{\text{кр}} \approx 5$, $\min b''_{\text{кр}} \approx 7{,}7$

с l, близкой к $l_{\text{кр}}$, усиливаются, и система покидает стационарное состояние. Затем она стабилизируется в новом стационарном состоянии, уже пространственно неоднородном. На рис. 15.14 показано вычисленное стационарное распределение X и Y в пространстве для системы (15.49), возникающее за пределами неустойчивости, нарушающей симметрию.

При рассмотрении точечного и распределенного «брюсселятора» мы пренебрегли обратными реакциями и, тем самым, удалились от равновесия. Пространственная структура, изображенная на рис. 15.15, стабилизована потоком энергии и вещества, проходящим сквозь открытую систему. Эта дис-

сипативная структура характеризуется меньшей энтропией, чем исходная гомогенная система,— осуществлен *порядок через флуктуации.*

Конечно, реальная система не является однородной с постоянными граничными условиями. Сами концентрации (безразмерные) a и b, фигурирую-

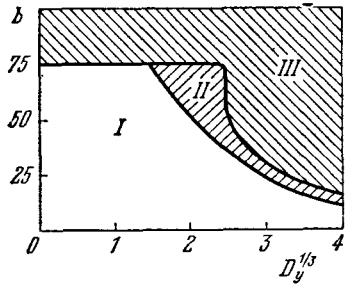


Рис. 15.15. Свойства рассматриваемой автокаталитической системы при заданных a, D_a, D_x и при $D_b \to \infty$ как функции b и D_y (в произвольных единицах): *I* — область устойчивого стационарного состояния, *II* — область монотонного возрастания флуктуаций, *III* — область усиливаемых колебаний

щие в качестве параметров, зависят от r и t. Рассмотрим ту же систему (15.49), считая для простоты b постоянным, но учитывая изменение a:

$$\frac{\partial a(r, t)}{\partial t} = -a(r, t) + D_a \frac{\partial^2 a(r, t)}{\partial r^2}. \qquad (15.52)$$

Ищем совместное решение уравнений (15.49) и (15.52), удовлетворяющее граничным условиям:

$$a(0) = a(L) = \bar{a}, \quad x(0) = x(L) = \bar{x},$$
$$y(0) = y(L) = \bar{y} \quad (0 \leqslant r \leqslant L).$$

Свойства этого решения следующие.

1. Вблизи равновесия имеется единственное устойчивое стационарное состояние.

2. Вдали от равновесия возможны различные ситуации, представленные на диаграмме (рис. 15.15).

3. В области *II* диаграммы термодинамическая (статическая) ветвь становится неустойчивой по отношению к флуктуациям химического состава.

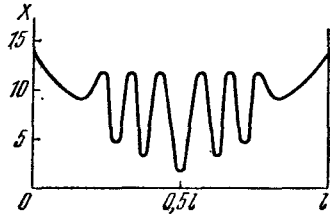


Рис. 15.16. Локализованная стационарная диссипативная структура, возникающая в области *II* предыдущей диаграммы

За порогом b начальные отклонения от стационарного состояния усиливаются и в конце концов приводят систему в новое стационарное состояние, соответствующее неоднородному распределению x и y (рис. 15.16).

4. Для $D_b \gg D_a \gg D_y \approx D_x$ термодинамическая ветвь неустойчива, система переходит в пространственно неоднородное состояние, зависящее от времени. Возникают *концентрационные волны*, распространяющиеся в реакционном объеме и отражающиеся от границ системы. В каждой точке происходят колебания концентрации.

5. При конечных значениях D_a описанные структуры локализованы внутри реакционного объема. Их границы, а также периоды определяются значениями величин a, b, D_x и т. д., независимо от начальных условий. При D_a, $D_b \to \infty$ структуры захватывают весь объем. Если D_x, D_y очень велики

по сравнению с химическими скоростями в области *III* (рис. 15.15), то пространственная зависимость исчезает и система осциллирует везде с одной и той же фазой. Реализуется предельный цикл, периодическое движение устойчиво.

Модель Тьюринга легла в основу ряда теоретических исследований морфогенеза. В дальнейшем, однако, выяснилось, что механохимические процессы при морфогенезе более существенны, чем автокатализ и диффузия (см. § 17.9).

§ 15.5. Фазовые переходы

Возникновение статического порядка из беспорядка в термодинамически равновесных условиях всегда происходит путем фазового перехода. В области перехода система неустойчива. При переходе первого рода, скажем, при переходе газ — жидкость, испытывают разрыв основные термодинамические величины — энтальпия, энтропия, объем. При переходе второго рода состояние системы меняется непрерывно, но скачком меняется симметрия. Разрыв испытывают не основные термодинамические величины, но их производные — теплоемкость, сжимаемость, коэффициент расширения. Пример — переход парамагнетик — ферромагнетик в точке Кюри.

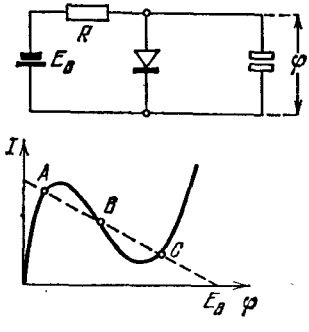


Рис. 15.17. Электрический контур с диодом и его вольт-амперная характеристика

Точки фазовых переходов — особые точки, в которых меняется характер функциональной зависимости химического потенциала от температуры и давления.

Как мы видели, переходы с возникновением пространственной или (и) временной упорядоченности вдали от равновесия также происходят скачкообразно, будучи связанными с неустойчивостями исходных состояний. Переход излучающих атомов при критическом значении параметра оптической накачки к когерентному, лазерному излучению обладает всеми особенностями фазового перехода.

Рассмотрим более простой физический пример — электрический контур с диодом (рис. 15.17). Прямая штриховая линия на графике изображает ток, текущий через сопротивление, как функцию напряжения на диоде, сплошная линия есть вольт-амперная характеристика диода. В стационарных состояниях токи, текущие через сопротивление и через диод, должны быть равны — этому отвечают точки A, B, C. Для определения устойчивости этих состояний нужно, как всегда, линеаризовать вблизи них уравнения, описывающие контур. Линеаризованный контур содержит емкость, включенную параллельно с линейным сопро-

тивлением R и дифференциальным сопротивлением $d\varphi/dI$ диода. Если эти два параллельных сопротивления положительны, контур устойчив. Это справедливо для точек A и C, но не B. Система имеет два различных устойчивых стационарных состояния A и C, она бистабильна, и переход из одного состояния в другое имеет характер фазового перехода. Система является проточной, неравновесной.

Обратимся теперь к автокаталитическим химическим реакциям (Шлёгль, 1972). Мы видели, что химические процессы такого рода могут приводить к возникновению динамической упорядоченности.

Рассмотрим реакции

$$A + 2X \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} 3X, \qquad (I)$$

$$B + X \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} C. \qquad (II)$$

Суммарная реакция есть $A + B \rightleftharpoons C$. Скорости реакций равны

$$v_1 = k_1 A X^2 - k_{-1} X^3, \quad v_2 = k_2 B X - k_{-2} C. \qquad (15.53)$$

Положим для простоты $k_{-1} = 1$, $k_1 A = 3$ и обозначим $k_2 B = f$, $k_{-2} C = g$. Скорость изменения концентрации X равна

$$\dot{X} = v_1 - v_2 = -X^3 + 3X^2 - fX + g. \qquad (15.54)$$

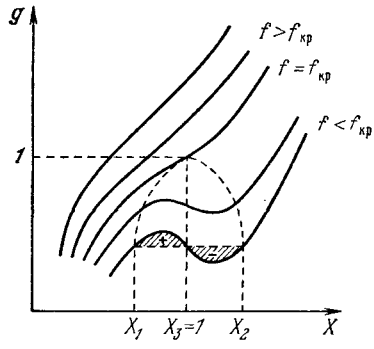


Рис. 15.18. Фазовый переход первого рода в автокаталитической химической реакции

В стационарных состояниях $\dot{X} = 0$ или

$$g = X^3 - 3X^2 + fX. \qquad (15.55)$$

Кривые $g(X)$, представляющие эту зависимость, показаны на рис. 15.18. Уравнение $\dot{X} = 0$ имеет три корня. Эти корни совпадают при критическом значении $f = f_{кр}$:

$$g = 1, \quad f_{кр} = 3, \quad X_{кр} = 1.$$

Три различных действительных и положительных значения корней $X_2 > X_3 > X_1$ возможны лишь при $f < 3$. Решения X_1, X_2 устойчивы, неустойчивый корень X_3 находится на убывающей ветви $g(X)$. Получилась картина, сходная с описанной для контура с диодом. Еще более поучительно сходство с диаграммой состояния газ — жидкость. При этом концентрация X играет роль плотности V^{-1}, величина g соответствует давлению p, а величина f соответствует температуре RT. Получаем

$$g = \frac{f}{V} - \frac{3}{V^2} + \frac{1}{V^3}. \qquad (15.55а)$$

Уравнение Ван-дер-Ваальса имеет вид

$$p = \frac{RT}{V-b} - \frac{a}{V^2}, \tag{15.56}$$

или, разлагая в ряд по b (вириальная форма),

$$p = \frac{RT}{V} + \frac{bRT-a}{V^2} + \frac{b^2RT}{V^3} + \ldots \tag{15.57}$$

Полная аналогия получается для вириального уравнения состояния

$$p = \frac{RT}{V} - \frac{a_1}{V^2} + \frac{a_2}{V^3} \tag{15.58}$$

с коэффициентами a_1 и a_2, не зависимыми от температуры.

Таким образом, в рассматриваемой автокаталитической системе при $f < f_{кр}$ происходит переход между двумя устойчивыми стационарными состояниями X_1 и X_2, подобный фазовому переходу первого рода. Внешним условиям, задаваемым f и g, отвечают два конкурирующих состояния X_1 и X_2. Этот переход не связан с нарушением симметрии (газ и жидкость имеют одинаковую симметрию). Можно показать, что условие Максвелла — равенство площадей + и − на рис. 15.18 — соблюдается.

Если одновременно с химической реакцией происходит диффузия вещества X — система является распределенной,— то при постоянных значениях A, B, C получаем

$$\dot{X} = g(X) + D\frac{\partial^2 X}{\partial r^2}, \tag{15.59}$$

причем $g(X)$ можно представить в виде

$$g(X) = \frac{\partial}{\partial X}\Phi(X) \equiv \frac{\partial}{\partial X}\left(\frac{1}{4}X^4 - X^3 + \frac{1}{2}fX^2\right), \tag{15.60}$$

где $\Phi(X)$ играет роль некоторого потенциала. Стационарные состояния удовлетворяют условию $\dot{X} = 0$, т. е. уравнению

$$D\frac{\partial^2 X}{\partial r^2} = -\frac{\partial \Phi}{\partial X}. \tag{15.61}$$

Это уравнение подобно уравнению, описывающему движение материальной точки в потенциальном поле, если D — «масса», r — «время», X — «координата». Имеется стационарное состояние, в котором сосуществуют две «фазы» X_1, X_2, причем $X \to X_1$ при $r \to \infty$ и $X \to X_2$ при $r \to -\infty$; значениям X_1 и X_2 соответствуют относительные максимумы $\Phi(X)$. В стационарном состоянии происходит перемещение «массы» D от одного максимума $\Phi(X)$, при котором эта «масса» покоилась, к другому максимуму, в котором она также достигает состояния покоя. Это возможно, лишь если значения Φ в обеих точках одинаковы (рис. 15.19):

$$\Phi(X_1) = \Phi(X_2). \tag{15.62}$$

Это — условие сосуществования двух «фаз», которое фиксирует значение g. Можно показать, что из этого условия следует

$$g = f - 2, \quad X_{1,2} = 1 \mp (3-f)^{1/2}, \quad X_3 = 1. \tag{15.63}$$

Наряду с фазовыми переходами первого рода нелинейные автокаталитические реакции могут приводить к неравновесным переходам, подобным фазовым переходам второго рода. Рассмотрим реакции

$$A + X \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} 2X, \qquad (I)$$

$$B + X \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} C. \qquad (II)$$

Их скорости равны

$$v_1 = k_1AX - k_{-1}X^2, \quad v_2 = k_2BX - k_{-2}C. \qquad (15.64)$$

Положим $k_1A = 1$, $k_{-1} = 1$, $k_2B = f$, $k_{-2}C = g$. Находим

$$\dot{X} = v_1 - v_2 = -X^2 + (1-f)X + g \equiv \varphi(X) + g; \qquad (15.65)$$

$\dot{X} > 0$ при малых X и $\dot{X} < 0$ при больших X. Следовательно, стационарное состояние, отвечающее $\dot{X} = 0$, устойчиво. В этом состоянии

$$g = X^2 - (1-f)X \equiv -\varphi(X). \qquad (15.66)$$

Если $g = 0$, то

$$X = \begin{cases} 1-f & \text{при } f < 1, \\ 0 & \text{при } f \geqslant 1. \end{cases} \qquad (15.67)$$

Такое поведение величины X характерно для фазового перехода второго рода, скажем, перехода из ферромагнитного в парамагнитное состояние. В этой аналогии X играет роль параметра упорядоченности (намагниченности), g — напряженности магнитного поля, f — температуры. Значение $f = f_{кр} = 1$ отвечает точке Кюри. При $f < f_{кр}$ происходит нарушение симметрии. Именно в критической точке малые флуктуации возрастают до макроскопических значений. На рис. 15.20 показаны кривые $X(f)$ при различных g.

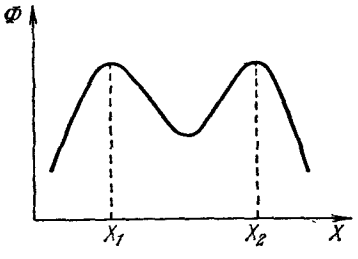


Рис. 15.19. Сосуществование фаз X_1 и X_2

Поведение модельной химической системы, подобное фазовому переходу, означает ее коллективные свойства. Переходы имеют характер «все или ничего». Они происходят в триггерных системах, являясь результатом малых флуктуаций.

Разнообразные биологические явления имеют динамический характер, подобный фазовым переходам. Развитие теории неравновесных фазовых переходов как механизмов биологических процессов представляется многообещающим. Уже получены некоторые интересные результаты. В работе Чайковского и Эбелинга

(1977) исследованы такие переходы в системах ферментативных реакций при наличии субстратного ингибирования и диффузии. Показана возможность пространственного разделения фаз, соответствующих комплексам фермента с несколькими молекулами

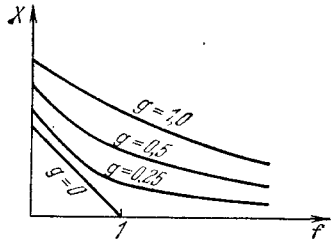


Рис. 15.20. Фазовый переход второго рода в автокаталитической химической реакции

субстрата. Белинцев и Волькенштейн (1977) показали, что возникновение нового вида в результате географического разделения популяции подобно фазовому переходу (см. с. 554). Сходные явления происходят в ряде мембранных процессов, в частности, при генерации нервного импульса (см. § 11.3, 16.5).

§ 15.6. Стохастические процессы

При описании динамических процессов мы применяли аппарат дифференциальных уравнений. Но, как уже говорилось (с. 494), при ограниченном числе молекул или особей приходится непосредственно учитывать дискретность их возникновения и уничтожения — актов «рождения» и «смерти». Не может появиться на свет или исчезнуть половина молекулы или половина зайца. Дискретные системы описываются стохастическими уравнениями, основанными на теории вероятностей. Ограничимся рассмотрением двух примеров.

Имеем систему химических реакций, уже рассматривавшуюся на с. 508:

$$A + X \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} 2X, \qquad (I)$$

$$B + X \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} C. \qquad (II)$$

Считая, что молекулы «рождаются» и «умирают», выведем *основное кинетическое уравнение* системы, причем в качестве переменных фигурируют уже не концентрации, а числа молекул. Обозначим через N число молекул X; распределение вероятностей, изменяющееся во времени, выражается функцией $P(N, t)$. В каждой из реакций N меняется на единицу. Рассмотрим все переходы. Начнем с реакции (II).

1. Переход $N \to N + 1$ — «рождение» молекулы X. Число таких переходов в единицу времени равно $P(N, t)W(N + 1, N)$, где $W(N + 1, N)$ — вероятность перехода, равная

$$W(N + 1, N) = k_{-2}CV,$$

где C — концентрация молекул C, т. е. их число в единице объема, V — объем, CV есть число реагирующих молекул C.

2. Переход $N-1 \to N$ — также «рождение» X. Число этих переходов в одну секунду равно $P(N-1, t)k_{-2}CV$. Учитывая, что «населенность» уровня N одновременно уменьшается вследствие процесса (I), получаем полную скорость перехода в реакции $C \to B + X$:

$$[P(N-1, t) - P(N, t)]k_{-2}CV.$$

Теперь рассмотрим реакцию $B + X \to C$. В этой реакции молекулы X «умирают», число N уменьшается на единицу. Имеем переходы $N+1 \to N$ и $N \to N-1$. Полная скорость есть

$$[P(N+1, t)(N+1) - P(N, t)N]k_2B,$$

где B — концентрация B. Аналогичным образом находим скорости для прямой и обратной реакций (I). В реакции $A + X \to 2X$ молекулы X «рождаются» со скоростью

$$[P(N-1, t)(N-1) - P(N, t)N]k_1A,$$

а в реакции $2X \to A + X$ «умирают» со скоростью

$$[P(N+1, t)(N+1)N - P(N, t)N(N-1)]k_{-1}/V.$$

Теперь мы можем написать кинетическое уравнение. Оно имеет вид

$$\dot{P}(N, t) = P(N-1, t)W(N, N-1) + P(N+1, t)W(N, N+1) - \\ - P(N, t)[W(N+1, N) + W(N-1, N)], \qquad (15.68)$$

где

$$W(N, N-1) = \left(k_1A\frac{N-1}{V} + k_{-2}C\right)V, \\ W(N, N+1) = \left[k_{-1}\frac{(N+1)N}{V^2} + k_2B\frac{N+1}{V}\right]V. \qquad (15.69)$$

Имеется трудность, состоящая в том, что стационарное решение (15.68) есть $P(0) = 1$, $P(N) = 0$ при $N \neq 0$. Поэтому нужно ввести третий процесс спонтанного рождения молекул X из молекул A

$$A \xrightarrow{k_1} X. \qquad (III)$$

При этом формулы (15.69) изменяются:

$$W(N, N-1) = \left(k_1A\frac{N}{V} + k_{-2}C\right)V, \\ W(N, N+1) = \left[k_{-1}\frac{(N+1)N}{V^2} + k_{-2}B\frac{N+1}{V}\right]V. \qquad (15.70)$$

Решение уравнения (15.68) имеет вид

$$P(N) = P(0)\prod_{n=0}^{N-1}\frac{W(n+1, n)}{W(n, n+1)}. \qquad (15.71)$$

Для того чтобы перейти к детерминистическому континуальному уравнению (15.64), (15.65), найдем средние значения N и вероятностей W. Имеем

$$\langle N\rangle = \sum_{N=0}^{\infty} NP(N, t), \qquad (15.72)$$

$$\langle W(N \pm 1, N)\rangle = \sum_{N=0}^{\infty} W(N \pm 1, N)P(N, t) \qquad (15.73)$$

и

$$\frac{d}{dt}\langle N\rangle = \langle W(N+1, N)\rangle - \langle W(N-1, N)\rangle. \qquad (15.74)$$

С помощью (15.69) находим

$$\frac{d}{dt}\langle N\rangle = \left[k_1 A \frac{\langle N+1\rangle}{V} + k_{-2}C - k_{-1}\frac{\langle N(N-1)\rangle}{V^2} - k_2 B\frac{\langle N\rangle}{V}\right]V. \quad (15.75)$$

Это уравнение совпадает с континуальным при больших N, когда можно пренебречь единицей по сравнению с N и заменить $\langle N\rangle/V$ на X. Получаем

$$\dot{X} = k_1 AX + k_{-2}C - k_{-1}X^2 - k_2 BX = v_1 - v_2,$$

что совпадает с (15.64). Замена $\langle N\rangle/V$ на концентрацию является вполне строгой, если P есть распределение Пуассона. Условием такого распределения является детальное равновесие для распределений в каждой из реакций (I) и (II) порознь. Это всегда справедливо при термодинамическом равновесии, но может не выполняться вдали от него. Поэтому вопрос о соотношении детерминистических и стохастических уравнений всегда требует специального исследования.

В качестве второго примера рассмотрим модель «хищник — жертва» Вольтерра (§ 15.3). Обозначим число зайцев через M, число рысей — через N. Размножение зайцев, т. е. переходы $M \to M+1$, описывается вероятностью

$$W(M+1, N; M, N) = k_1 M.$$

Смерть рысей описывается вероятностью переходов $N \to N-1$

$$W(M, N-1; M, N) = k_2 N.$$

При встречах рысей с зайцами происходят переходы $M \to M-1$, $N \to N+1$ с вероятностями

$$W(M-1, N+1; M, N) = kMN.$$

Мы положили $k' = k$ (см. с. 496). Основное кинетическое уравнение имеет вид

$$\dot{P}(M, N; t) = k_1(M-1)P(M-1, N; t) + k_2(N+1)P(M, N+1; t) +$$
$$+ k(M+1)(N-1)P(M+1, N-1; t) - (k_1 M + k_2 N + kMN)P(M, N; t). \quad (15.76)$$

Конечно, накладывается условие $P = 0$ при отрицательных значениях M и N. Единственное стационарное решение, $\dot{P} = 0$, отвечает $P(0, 0) = 1$ и все остальные $P = 0$. Иными словами, оба вида должны вымереть. Сопоставление с дифференциальными уравнениями Лотка — Вольтерра раскрывает смысл этого результата. Мы видели, что замкнутые фазовые траектории, охватывающие центр, могут изменяться при любых флуктуациях — система переходит с одной траектории на другую при изменении начальных условий. Если зайцы случайно вымерли, то рыси не смогут выжить и $M = N = 0$ есть единственное стационарное состояние. В природе зайцы могут укрываться от рысей или убегать от них в другие районы.

Мы видим, что анализ стохастического уравнения дает в этом случае новые поучительные результаты.

§ 15.7. Динамика и регуляция

Возникновение упорядоченного во времени и пространстве коллективного поведения открытой системы в результате перехода, подобного фазовому, означает наличие особых регуляторных возможностей у таких систем. Пространственная локализация вещества (см. с. 503) является вероятным механизмом стабилизации диссипативной структуры по отношению к изменениям химического окружения.

Локализованные структуры характеризуются производством больших количеств определенного вещества в ограниченной области пространства. Тем самым система обладает регуляторными

свойствами. Концентрационные волны (с. 504) представляют собой механизм распространения и передачи информации в форме химических, молекулярных сигналов, а стационарные локализованные структуры хранят информацию.

Биологические макромолекулы, надмолекулярные структуры, клеточные органоиды, клетки, организмы, популяции — сложные системы, т. е. совокупности элементов, взаимодействующих друг с другом. Изучение явлений жизни исходит из исследований этих взаимодействий. Вместе с тем физическое рассмотрение сложной системы не может не основываться на изучении составляющих ее элементов, взятых порознь, вплоть до молекулярного уровня организации. Сами взаимодействия определяются природой этих элементов. Соответственно мы имеем дело с ферментом и геном, с аксоном и миофибриллой, с митохондрией и хлоропластом. Эти элементы более сложных систем в свою очередь представляют собой сложные системы. Анализ явлений жизни на всех уровнях организации требует подходов, согласующихся с представлениями *общей теории систем*.

Специфические взаимодействия в биологической системе приводят к регуляции ее поведения, к поддержанию постоянных значений жизненно важных параметров у системы, находящейся в стационарном режиме, и к направленной самоорганизации развивающегося организма. В биологии давно фигурирует понятие *гомеостаза*, означающее стационарное состояние внутренней среды. Однако, как указал Уоддингтон, следует говорить не о гомеостазе, а о *гомеорезе* — жизненные явления имеют характер динамический и существенна стабилизация потоков. Гомеорез означает наличие стационарного состояния или стационарной замкнутой траектории на фазовом портрете открытой системы, в частности, предельного цикла. Гомеорез поддерживается регуляторными процессами, восстанавливающими фазовые траектории при отклонениях от них, вызванных изменениями условий.

В этой книге не раз подчеркивалось, что организмы представляют собой химические машины, в которых посылка, рецепция и преобразование сигналов имеют молекулярную природу. В искусственных твердотельных машинах есть лишь один способ борьбы с дефектами или износом деталей — их замена новыми. Сколько-нибудь значительные допуски в таких машинах недопустимы. Напротив, химическая машина организма характеризуется большими «люфтами», недостатки преодолеваются посредством целого ряда компенсаторных механизмов, работающих как на метаболическом, так и на генетическом уровне (см. также § 17.7).

Пользуясь языком теории регулирования, скажем, что открытая система характеризуется наличием входного и выходного сигналов — воздействием на систему и ее ответной реакцией на воздействие. Закон поведения системы определяет зависимость выходной величины от входного воздействия. Задачи теории систем в их общей формулировке состоят в комбинировании двух

известных факторов с целью нахождения третьего. Эти три фактора — входная величина, закон поведения, выходная величина. Основные проблемы биофизики сводятся к нахождению структуры и законов поведения «*черного ящика*» — биологической системы. «Черными ящиками» являются и фермент, и клетка, и организм. Инженер создает «*белый ящик*» — машину, преобразующую входные сигналы в выходные в соответствии с поставленной целью. В биологии «ящики» созданы природой и задача физики состоит в исследовании их внутреннего устройства и функциональности.

Регуляция, обеспечивающая поддержание гомеореза или оптимальные реакции на внешние воздействия, осуществляется в результате взаимодействия между выходными и входными сигналами, т. е. вследствие *обратной связи*. В простейшем случае регуляция поддерживает выходную величину на постоянном уровне, например, температуру лабораторного термостата. Простейшая регулируемая система содержит управляющее устройство, подвергающееся воздействию выходного сигнала, и объект управления, выдающий этот сигнал (см. с. 463).

Взаимодействия в биологической системе являются сильными — химическими и слабыми — межмолекулярными (см. § 2.11). Как правило, химические реакции, а также слабые кооперативные взаимодействия нелинейны. Нелинейность необходима для реализации системы управления. Кооперативность всегда означает нелинейность ответа системы на входной сигнал.

Как мы видели, нелинейные системы ведут себя весьма разнообразно. Наличие множественных стационарных состояний определяет возможности переключения системы из одного режима в другой даже при слабых воздействиях. Таким образом, нелинейные системы обладают регуляторными возможностями.

Математический аппарат теории управляющих систем есть аппарат дифференциальных уравнений. Такое уравнение описывает связь между входными и выходными сигналами. Так называемый метод передаточных функций, основанный на применении преобразования Лапласа, позволяет получить феноменологическое описание систем управления. При этом эффективен описанный выше метод фазовых портретов, позволяющий непосредственно анализировать проблемы устойчивости.

Рассмотрение организма как регулируемой системы, проводимое физико-математическими методами, есть основа теоретической физиологии. В § 16.6 рассмотрена в качестве примера проблема фибрилляции сердечной мышцы. Теория позволяет установить параметры, от которых зависит поведение системы, и указать способы воздействия на эти параметры. В сущности, такой же характер имеет целый ряд физиологических проблем (в частности, проблема иммунитета, § 17.11). Необходимо раскрыть физическую сущность регуляторных явлений, установить, от чего зависит регуляция, и тем самым найти причины патологических отклонений. В этом смысле физика есть основа физиологии.

Глава 16

ПЕРИОДИЧЕСКИЕ ХИМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

§ 16.1. Введение

В предыдущей главе мы ознакомились с автоколебательными и автоволновыми процессами, характерными для открытых систем, находящихся вдали от равновесия. Единственный экспериментальный факт, который мы пока привлекли, состоял в периодическом изменении популяций зайцев и рысей, соответствовавшем модели Вольтерра (с. 498). Однако таких биологических фактов множество. На всех уровнях организации, от макромолекулярного до популяционного, в биологических системах происходят незатухающие колебания характеристических физических параметров — ферментативной активности, концентрации метаболитов, параметров, определяющих физиологическое поведение, численности популяций и т. д.

Можно привести аргументы в пользу того, что биологическая система не только может, но и должна быть колебательной. Первый аргумент следует из всего изложенного в предыдущей главе. Сложная открытая система, включающая автокаталитические химические реакции, вдали от равновесия зачастую выходит на предельные циклы. Следовательно, автоколебания в такой системе весьма вероятны. Второй аргумент приведен Молчановым. Биологические системы являются результатом длительной эволюции. Устойчивые системы за время эволюции должны были уравновеситься, стать частью среды. Напротив, неустойчивые системы за это время распались. Следовательно, лишь системы, внутренние движения в которых имеют колебательную природу, могли сохраниться.

Эволюция — добиологическая и биологическая — происходила на Земле, вращающейся вокруг Солнца и вокруг собственной оси. Это не могло не отразиться на самом ходе эволюции (см. § 17.5). В то же время эволюция в условиях периодической смены температуры, освещенности и увлажнения должна была запечатлеться в физиологии как животных, так и растительных организмов. Это третий аргумент. Суточная периодичность действительно свойственна жизненным процессам. В связи с этим было введено понятие *биологических часов*. Биологические колебания с периодом, близким к суточному, такие, например, как смена сна и бодрствования, называются *циркадными ритмами*. Циркадные ритмы повсеместны в живой природе, они имеют эндогенный,

врожденный характер. Физическая причина циркадных ритмов несомненно лежит в автоколебательных процессах — их периоды практически независимы от температуры и других внешних факторов. Циркадные ритмы автономны как на организменном, так и на клеточном уровне.

Четвертый, не менее существенный аргумент состоит в том, что сколько-нибудь сложная машина может работать непрерывно лишь путем периодического преобразования энергии в работу. Периодичность свойственна любым движущимся устройствам — одним из величайших изобретений *Homo sapiens* было колесо (см., впрочем, с. 413). Очевидно, что сложная живая система, обладающая автономным существованием, эволюционно достигает уровня периодически работающей машины — мы имеем в виду системы дыхания и кровообращения. Движения животного — бег гепарда, прыжки кенгуру, полет птицы, плавание рыбы, скольжение змеи, движение ресничек инфузории — представляют собой периодические, зачастую *автоволновые процессы* превращения химической энергии в механическую работу (гл. 12). Теоретическое и экспериментальное исследование химических и биологических периодических явлений имеет поэтому весьма важное значение для биофизики, биохимии, физиологии, для биологии в целом.

§ 16.2. Реакции Белоусова — Жаботинского

Начнем рассмотрение периодических процессов с химических автоколебательных явлений.

В 1959 г. Белоусов в краткой заметке сообщил об открытии им периодических изменений цвета раствора с частотой порядка 10^{-2} Гц в ходе окисления лимонной кислоты броматом, причем катализатором были ионы церия. Изменение окраски определялось периодическими превращениями $Ce^{3+} \rightleftarrows Ce^{4+}$. Белоусов наблюдал десятки периодов. В дальнейшем детальные экспериментальные и теоретические исследования этих и родственных им явлений были проведены Жаботинским с сотрудниками (1964—1974).

Реакции Белоусова — Жаботинского — окислительно-восстановительные реакции. Рассмотрим в качестве примера реакцию, в которой окислителем является бромат (ион BrO_3^-), восстановителем — малоновая кислота (МК, $H_2C(COOH)_2$), а катализатором — ионы церия. Колебания окраски, определяемые изменениями концентрации Ce^{4+}, являются релаксационными (рис. 16.1, *а*). Их период τ делится на две фазы, τ_1 и τ_2 — нарастания и падения $[Ce^{4+}]$. Упрощенная схема реакции содержит две соответствующих стадии:

$$Ce^{3+} \xrightarrow{BrO_3^-,\,H^+} Ce^{4+} \quad \text{(I, окисление)},$$

$$Ce^{4+} \xrightarrow{\text{МК}} Ce^{3+} \quad \text{(II, восстановление)}.$$

Продукты восстановления бромата, образующиеся на стадии I, бромируют малоновую кислоту. Получается броммалоновая кислота (БМК), которая далее разрушается с выделением Br^-. Ион бромида сильно ингибирует реакцию.

Колебательный процесс происходит следующим образом. В системе имеется начальное количество Ce^{4+}. Тогда на стадии

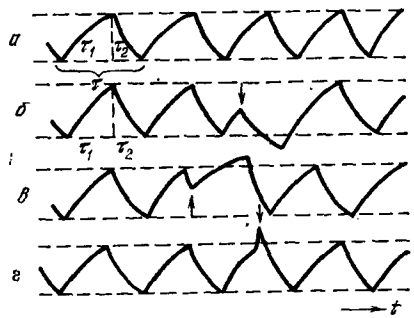


Рис. 16.1. Автоколебания концентрации Ce^{4+} (*а*); скачки фаз в ходе колебаний Ce^{4+}, вызываемые однократными добавками Br^- (*б*), Ag^+ (*в*), Ce^{4+} (*г*). Стрелками указаны моменты добавления

II образуется Br^-, который ингибирует реакцию I и с некоторой скоростью исчезает из системы. Концентрация Ce^{4+} понижается как вследствие восстановления в реакции II, так и вследствие торможения реакции I бромидом. Когда $[Ce^{4+}]$, расходуемая в реакции II, уменьшается до нижнего порогового значения, падает и концентрация Br^-. Вновь начинается реакция I и концентрация Ce^{4+} возрастает. При достижении верхнего порогового значения $[Ce^{4+}]$ резко возрастает $[Br^-]$, что приводит к торможению реакции I. После этого цикл повторяется.

Эта схема подтверждается следующими экспериментальными фактами.

1. Малые количества Br^-, введенные в систему в фазе нарастания $[Ce^{4+}]$, вызывают переключение (рис. 16.1, *б*). Минимальное количество Br^-, вызывающее переключение, уменьшается к концу τ_1.

2. Br^-, добавленный в фазе τ_2, удлиняет ее. Эффект тем сильнее, чем больше добавка и чем она ближе к концу τ_2.

3. Добавка Ag^+, связывающего Br^-, вызывает противоположные события. Введение Ag^+ в фазу τ_2 приводит к переключению (рис. 16.1, *в*), а добавка в фазе нарастания увеличивает τ_1.

4. Если в систему, находящуюся в колебательном режиме, непрерывно медленно добавлять Br^-, то колебания прерываются и $[Ce^{4+}]$ остается на нижнем пороге. После прекращения подачи Br^- колебания возобновляются.

5. Сходный результат получается при медленном добавлении Ce^{4+}.

6. Добавление Ce^{4+} в фазу τ_1 вызывает переключение (рис. 16.1, *г*).

Общая схема реакции показана на рис. 16.2.

Эти опыты очень эффектны — окраска раствора периодически переходит из голубой в розовую и обратно.

В автоколебательных реакциях такого типа восстановитель должен легко окисляться окисленной формой катализатора и не должен реагировать непосредственно с бромат-ом. Нужно также, чтобы восстановитель легко бромировался и получаемые бромпроизводные разлагались, выделяя Br^-. Был изучен ряд реакций с различными восстановителями.

Прямыми опытами показано, что реакции вполне гомогенны; поверхность реакционного сосуда не влияет ни на ход данной периодической реакции, ни на зависимость устойчивости от концентрации реагентов.

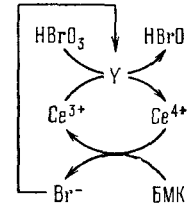


Рис. 16.2. Общая схема периодической химической реакции

Реакции Белоусова — Жаботинского весьма сложны, учет всех их стадий затруднителен. По-видимому, число стадий не меньше 11. Однако можно упростить задачу и объяснить колебания в гомогенном растворе, исходя из трех ключевых веществ: 1) $HBrO_2$, играющего роль промежуточного переключателя, 2) Br^- — контролирующего промежуточного соединения и 3) катализатора Ce^{4+}. Доминируют реакции:

при достаточном количестве Br^-

$$BrO_3^- + Br^- + 2H^+ \xrightarrow{k_1} HBrO_2 + HBrO, \qquad (I)$$

$$HBrO_2 + Br^- + H^+ \xrightarrow{k_2} 2HBrO; \qquad (II)$$

при малом количестве оставшегося Br^-

$$BrO_3^- + HBrO_2 + H^+ \xrightarrow{k_3} 2BrO_2 + H_2O, \qquad (III)$$

$$2BrO_2 + 2Ce^{3+} + 2H^+ \xrightarrow{k_4} 2HBrO_2 + 2Ce^{4+}, \qquad (IV)$$

$$2HBrO_2 \xrightarrow{k_5} BrO_3^- + HBrO + H^+. \qquad (V)$$

Первая стадия определяет скорость. Бромноватистая кислота HBrO быстро расходуется на бромирование МК. В стадиях (I) и (II) достигается квазистационарное состояние (A):

$$k_2 [HBrO_2]_A [Br^-] [H^+] \approx k_1 [BrO_3^-] [H^+]^2 [Br^-],$$

т. е.

$$[HBrO_2]_A \approx (k_1/k_2) [BrO_3] [H^+],$$

причем $k_1/k_2 = 10^{-9}$.

В последующих реакциях скорость лимитируется (III). Стадии (III) и (IV) вместе являются автокаталитическими по отношению к $HBrO_2$. Новое квазистационарное состояние (B) отвечает условию

$$k_5 [HBrO_2]_B^2 \approx k_3 [BrO_3^-] [HBrO_2] [H^+],$$

или

$$[HBrO_2]_B \approx (k_3/k_5) \cdot [BrO_3^-] [H^+],$$

где $k_3/k_5 \approx 10^{-4}$, $k_3 = 10^4$ M^{-2} c^{-1}.

Стадии (II) и (III) показывают, что Br^- и BrO_3^- конкурируют за $HBrO_2$. Автокаталитическая продукция $HBrO_2$ невозможна, пока

$k_2[Br^-] > k_3[BrO_3^-]$. При критической концентрации бромида:

$$[Br^-]_{кр} = \frac{k_3}{k_2}[BrO_3^-] \approx 5\cdot 10^{-6}[BrO_3^-],$$

реакция переключается с (I), (II) на (III), (IV). С возрастанием $[HBrO_2]$ убывает $[Br^-]$ согласно (II) и проходит через критический уровень. С другой стороны, продуцированный в (IV) Ce^{4+} регенерирует Br^-:

$$4Ce^{4+} + BrCH(COOH)_2 + H_2O + HBrO \xrightarrow{k_6} 2Br^- + 4Ce^{3+} + 3CO_2 + 6H^+, \quad (VI)$$

$[Br^-]$ вновь превышает $[Br^-]_{кр}$ и восстанавливается уровень $[HBrO_2]_A$.

Математическая модель процесса («*орегонатор*») следующая. Обозначим $X = [HBrO_2]$, $Y = [Br^-]$, $Z = 2[Ce^{4+}]$, $A = [BrO_3^-]$, P, Q — прочие продукты. Уравнения (I)—(VI) перепишутся в виде

$$A + Y \xrightarrow{k_1} X, \quad X + Y \xrightarrow{k_2} P, \quad A + X \xrightarrow{k_{3,4}} 2X + Z,$$
$$2X \xrightarrow{k_5} Q, \quad Z \xrightarrow{k_6} \nu Y.$$

Здесь ν — подходящий стехиометрический коэффициент. Константы скорости, оцененные из опыта: $k_1 = 1{,}34\ M^{-1}c^{-1}$, $k_2 = 1{,}6\cdot 10^9\ M^{-1}c^{-1}$, $k_{3,4} = 8\cdot 10^3\ M^{-2}c^{-1}$, $k_5 = 4\cdot 10^7\ M^{-1}c^{-1}$. Значения ν и k_6 — параметры. Принимаются постоянные $A = 0{,}06$ M, $[H^+] = 0{,}8$ M. Нелинейные уравнения необратимых, т. е. далеких от равновесия, реакций имеют вид

$$\begin{aligned} \dot{X} &= k_1AY - k_2XY + k_{3,4}AX - 2k_5X^2, \\ \dot{Y} &= -k_1AY - k_2XY + \nu k_6 Z, \\ \dot{Z} &= k_{3,4}AX - k_6Z. \end{aligned} \quad (16.1)$$

Вводим безразмерные переменные

$$x = \frac{k_2}{k_1A}X, \quad y = \frac{k_2}{k_{3,4}A}Y, \quad z = \frac{k_2k_6}{k_1k_{3,4}A^2}Z,$$
$$\tau = A\sqrt{k_1k_{3,4}}\,t, \quad q = 2\frac{k_1k_5}{k_2k_{3,4}}, \quad s = \sqrt{\frac{k_{3,4}}{k_1}}, \quad (16.2)$$
$$w = \frac{k_6}{A\sqrt{k_1k_{3,4}}}.$$

Получаем

$$\frac{dx}{d\tau} = s(y - xy + x - qx^2), \quad \frac{dy}{d\tau} = \frac{1}{s}(-y - xy + \nu z), \quad \frac{dz}{d\tau} = w(x - z). \quad (16.3)$$

Из приведенных оценок следует, что $q = 8{,}4\cdot 10^{-6}$, $s \approx 80$ и $w = 0{,}16k_6$. Система имеет две временных шкалы — эволюция x определяется большой константой s, а эволюция y и z — малыми константами.

Стационарные решения (16.3) имеют вид

$$z_0 = x_0, \quad y_0 = \frac{\nu x_0}{1 + x_0} = {}^1/_2[(1 + \nu) - qx_0]. \quad (16.4)$$

Второе уравнение (16.4) эквивалентно получаемому из первого уравнения (16.3)

$$qx_0^2 + [q - (1 - \nu)]x_0 - (1 + \nu) = 0.$$

При линеаризации по уже известному правилу (с. 500)

$$x = x_0 + \alpha \exp(\lambda\tau), \quad y = y_0 + \beta \exp(\lambda\tau), \quad z = z_0 + \gamma \exp(\lambda\tau).$$

Эта система сложнее ранее рассмотренных (модель Лотка — Вольтерра, брюсселятор) — характеристическое уравнение не второго, а третьего порядка:

$$\lambda^3 - f\lambda^2 + g\lambda - h = 0, \qquad (16.5)$$

где f, g, h зависят от x_0, y_0, z_0 и от параметров s, w, ν, q, причем ν и w варьируются. Автоколебательный процесс, т. е. предельный цикл, возникает, если точка (x_0, y_0, z_0) неустойчива. Можно показать, что область таких решений действительно существует, если

$$0{,}50 < \nu < 2{,}41.$$

На рис. 16.3 показан предельный цикл на плоскости lg X, lg Y.

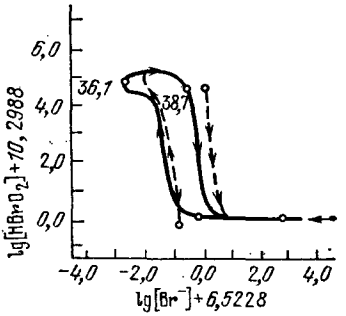


Рис. 16.3. Предельный цикл для «орегонатора»

Можно управлять режимом колебаний посредством внешних воздействий. Таковыми являются постоянный приток Br^- или воздействие на раствор ультрафиолетовым светом, приводящее к тем же результатам, так как этот свет разлагает БМК с выделением Br^-. Автоколебания синхронизуются при воздействии периодической внешней силы — прямоугольных световых импульсов с частотой повторения, близкой к частоте автоколебаний. Конечно, процесс прекращается, когда вся МК окисляется до CO_2 (реакция (VI)).

Мы рассмотрели точечную, сосредоточенную систему. Если система распределенная, т. е. наряду с химическими реакциями имеется диффузия (см. § 15.4), то в ней могут возникать волновые процессы, пространственные и временные характеристики которых не зависят от начальных условий,— *автоволновые процессы*.

Мы уже говорили об автоволнах в возбудимых, активных средах, рассматривая распространение нервного импульса (гл. 11). Среда, в которой происходит реакция Белоусова — Жаботинского, есть активная среда.

Жаботинский и Заикин наблюдали и изучали автоволновые процессы в описанной химической системе. Для того чтобы система была распределенной, необходимо отсутствие конвекции при наличии диффузии. Это осуществляется в тонких трубках (одномерная система) или в тонких слоях (двумерная система). В качестве катализатора применялся не Ce^{3+}, а ферроиновый комплекс железа. Возбуждение системы производится прикосновением к поверхности раствора иглой, смоченной раствором $AgNO_3$ (Ag^+ связывает Br^-) или нагретой проволокой. Возникают волны, бегущие со скоростью около 0,01 см/с. Экспериментально были обнаружены точечные источники автогенерации —

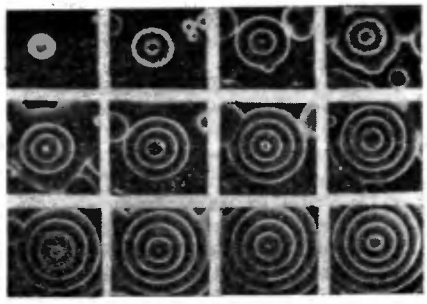


Рис. 16.4. Ведущие центры

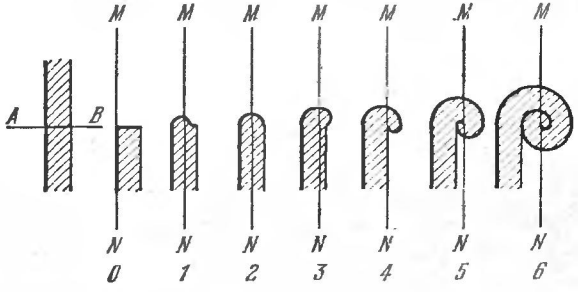


Рис. 16.5. Схема образования ревербератора из разрыва фронта волны. Жирная линия — зона возбуждения, AB — линия разрыва фронта, 0—6 — последовательные моменты времени, MN — линия фронта в момент 6

Рис. 16.6. Химические реверберaторы. Черные кружки — пузырьки воздуха

ведущие центры (ВЦ), возникающие в однородной среде в результате локальных флуктуаций концентрации, т. е. особых начальных условий. Концентрационные волны распространяются из ВЦ с постоянной скоростью. На рис. 16.4 показаны ВЦ, сфотографированные в указанной системе через каждые 30 с.

При разрыве волнового фронта может возникать *ревербератор* — спиральная волна. Ревербератор образуется, в частности, при движении волны в двумерной среде вокруг отверстия — спираль является разверткой (эвольвентой) отверстия.

Схема образования ревербератора показана на рис. 16.5. Жаботинский и Заикин наблюдали спиральные волны, вызванные

Рис. 16.7. Лишайник *Parmelia centrifuga*

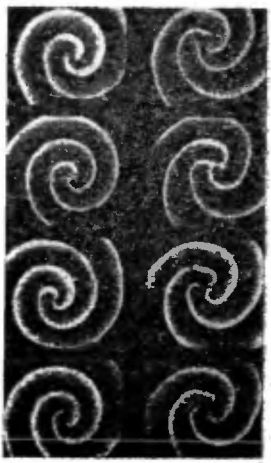


Рис. 16.8. Спиральные волны

нарушением однородности системы — локальным понижением кислотности. На рис. 16.6 показана фотография химических реверберато́ров, а на рис. 16.7 — фотография лишайника. Внешнее сходство бросается в глаза. Конечно, периодический рост лишайника не является аналогом поведения рассмотренных химических систем, но есть все основания считать, что химические автоколебательные и автоволновые процессы моделируют важные биологические явления.

Уинфри изучал трехмерные автоволны в системах Белоусова — Жаботинского. Агладзе и Кринский обнаружили в этих системах спиральные волны с топологическим зарядом (ТЗ) более единицы. ТЗ спиральной волны равен изменению фазы, выраженному в единицах 2π при обходе по замкнутому контуру, охватывающему ядро волны. ТЗ простой спиральной волны равен единице. На рис. 16.8 показаны спиральные волны с ТЗ = = 1, 2, 3, 4.

§ 16.3. Автоколебания при гликолизе

Нелинейности в кинетике биохимических, ферментативных процессов проявляются в ряде случаев в наблюдаемой их периодичности. Происхождение колебаний в биохимических системах в целом понятно — они определяются автокатализом и в этом смысле моделируются периодическими реакциями в неживой природе.

Мы уже встречались с нелинейными биохимическими процессами — с кооперативными ферментативными реакциями (§ 6.7). Химические процессы, следующие закону действия масс, как правило, нелинейны. Нелинейны взаимодействия элементов полиферментной системы и взаимодействия таких систем друг с другом. Типично нелинейными ферментативными процессами являются реакции, ингибируемые избытком субстрата или кофермента. Реакция

$$X + Y' \xrightarrow{E} X' + Y_i$$

катализируемая ферментом E, ингибируется активной формой кофермента Y′. Схема реакции показана на рис. 16.9. При определенных условиях система характеризуется неустойчивыми стационарными состояниями и может стать автоколебательной (Сельков).

Периодические, автоколебательные явления свойственны процессу *гликолиза* — анаэробного превращения шестичленных сахаров в трикарбоновые кислоты, сопровождающегося синтезом АТФ (см. § 2.10). Упрощенная схема процесса показана на рис. 16.10. В опытах Чанса, Гесса и сотрудников сначала были обнаружены затухающие концентрационные колебания в гликолизе, затем были открыты незатухающие автоколебания (1964). На рис. 16.11 показаны колебания концентрации одного из продуктов гликолиза — НАД.H_2, имеющие почти синусоидальный характер. Как показал Сельков, кинетика процесса в целом определяется несколькими «узкими местами», обозначенными на рис. 16.10 цифрами *1—4*. Обозначим через v_0 скорость реакции *1*, катализируемой ферментом гексокиназой (ГК). Реакция $C_6' \rightleftarrows C_6''$ быстрая и обратимая, поэтому можно считать концентрации этих гексоз пропорциональными друг другу. Концентрация X любого из веществ C_6', C_6'' возрастает со скоростью v_0 и убывает за счет реакции *2*, катализируемой фосфофруктокиназой (ФФК). Далее, вплоть до реакции *3* протекает несколько быстрых обратимых реакций и, следовательно, концентрации промежуточных веществ пропорциональны друг другу. Обозначим одну из этих концентраций Y. ФФК активируется продуктами своей реакции, т. е. веществом Y. Поэтому увеличение Y за счет реакции *2* зависит как от X, так и от Y. Скорость возрастания Y,

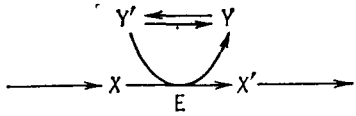


Рис. 16.9. Реакция с субстратным ингибированием

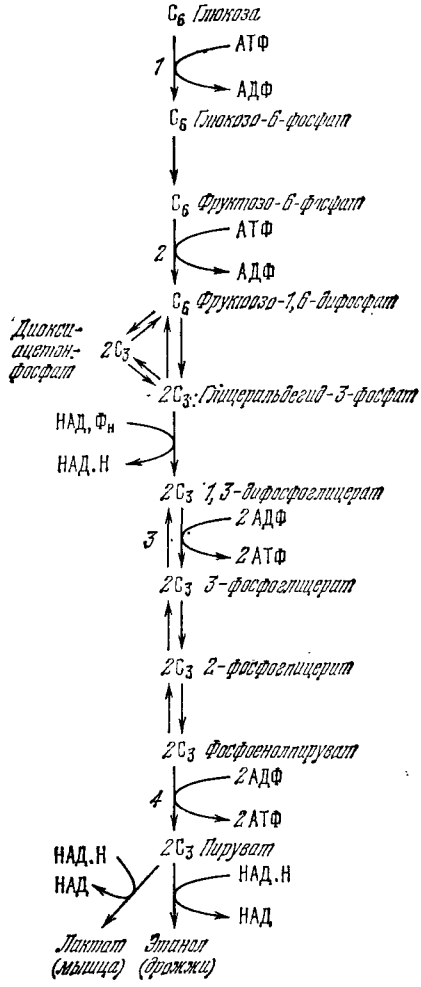


Рис. 16.10. Упрощенная схема гликолиза C_6 и C_3 — шести- и трехуглеродные соединения; *1—4* — реакции, определяющие кинетику процесса в целом

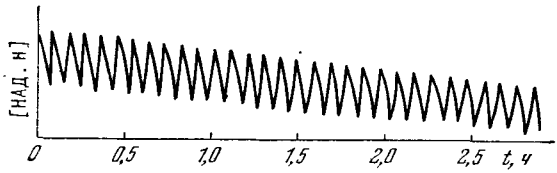


Рис. 16.11. Колебания концентрации НАД·Н в экстракте дрожжей

равна скорости убыли X. В реакции *3*, катализируемой пируваткиназой (ПК), Y убывает. Получаем кинетические уравнения

$$\dot{X} = v_0 - k_1 \frac{X}{K_X + X} \frac{Y}{K_Y + Y},$$
$$\dot{Y} = k_1 \frac{X}{K_X + X} \frac{Y}{K_Y + Y} - k_2 \frac{Y}{K + Y}. \qquad (16.6)$$

В работе Селькова (1968) вместо множителя $Y/(K_Y + Y)$ фигурирует $Y^2/(K_Y + Y)^2$, т. е. вводится более высокий порядок активации ФФК, что обосновывается биохимическими данными. Однако уже простая система (16.6) обладает интересующей нас нелинейностью. Более того, автоколебательный режим получается и при дальнейшем упрощении, если принять, что $K_X \gg X$, $K_Y \gg Y$. Получаем систему

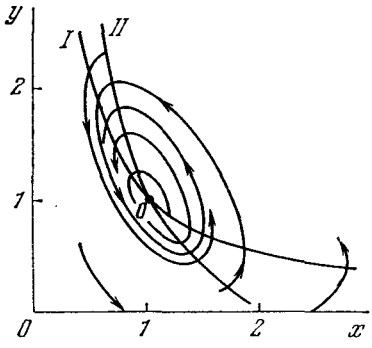


Рис. 16.12. Фазовый портрет колебаний при гликолизе

$$\dot{X} = v_0 - k_1' XY,$$
$$\dot{Y} = k_1' XY - k_2' \frac{Y}{1 + Y/K}, \qquad (16.7)$$

подобную системе Лотка (см. с. 495). Здесь $k_1' = k_1 K_X K_Y$, $k_2' = k_2/K$; v_0 пропорционально содержанию ГК, k_1'—содержанию ФФК и k_2'— содержанию ПК.

Стационарные концентрации X и Y равны

$$X_0 = \frac{k_2' - v_0/K}{k_1'}, \quad Y_0 = \frac{v_0}{k_2' - v_0/K}.$$

Введем безразмерные переменные

$$x = \frac{X}{X_0}, \quad y = \frac{Y}{Y_0}, \quad \tau = k_1' Y_0 t = \frac{k_1' v_0}{k_2' - v_0/K} t.$$

Уравнения (16.7) принимают вид

$$\frac{dx}{d\tau} = 1 - xy, \quad \frac{dy}{d\tau} = qy\left(x - \frac{1+r}{1+ry}\right), \qquad (16.8)$$

где

$$q = \frac{(k_2' - v_0/K)^2}{v_0 k_1'}, \quad r = \frac{Y_0}{K} = \frac{v_0/K}{k_2' - v_0/K}.$$

Фазовый портрет системы на плоскости x, y и главные изоклины (см. с. 488) показаны на рис. 16.12. Изоклина вертикальных касательных (*I*) — гипербола $y = 1/x$, горизонтальных касательных (*II*) — гипербола $x = (1+r)/(1+ry)$ и прямая $y = 0$. Линеаризуя уравнения (16.8), определяем характер особой точки 0. Корни характеристического уравнения равны

$$\lambda_{1,2} = -\frac{1}{2}\left(1 - \frac{qr}{1+r}\right) \pm \frac{1}{2}\left[\left(1 - \frac{qr}{1+r}\right)^2 - \frac{4q}{1+r}\right]^{1/2}.$$

При $4q/(1+r) > (1 - qr/(1+r))^2$ точка 0 есть фокус. Если $qr/(1+r) < 0$, фокус устойчив, если $qr/(1+r) > 0$, фокус неустойчив и возникает предельный цикл. При $qr/(1+r) = 1$ происходит бифуркация. Вблизи этой точки,

если $|qr/(1+r)-1| \ll 1$, частота колебаний равна мнимой части корня характеристического уравнения, т. е.

$$\omega \approx \sqrt{\frac{q}{1+r}}. \qquad (16.9)$$

Таким образом, система (16.7) при определенных условиях оказывается автоколебательной. Увеличение параметра q способствует нарастанию автоколебаний, уменьшение q — затуханию. Из выражения для q следует, что уменьшение k_1' и скорости притока v_0 должно вызывать самовозбуждение колебаний. К тому же результату должно приводить увеличение k_2', т. е. добавка ПК. Это согласуется с опытом.

§ 16.4. Нелинейная динамика мембран

Как мы видели, нелинейные свойства возбудимых мембран отчетливо проявляются в генерации и распространении нервного импульса (гл. 11). Рассмотрим периодические изменения состояния мембран, установленные в ряде опытов. Так, наблюдались колебания электрического потенциала в очень тонких двойных полиэтиленовых мембранах. Двойной слой состоял из поликислоты (a) и полиоснования (b). Таким образом, в нем имелись три зоны — отрицательно заряженная a, нейтральная и положительно заряженная b (рис. 16.13). Мембрана помещалась в 0,15 М раствор NaCl. При наложении отрицательного потенциала со стороны полиоснования наблюдались периодические импульсы (спайки) и при некотором критическом значении тока незатухающие колебания, сохраняющиеся часами. Ток через мембрану состоит из перемещения катионов сквозь зону a и анионов сквозь зону b. В результате в центральной нейтральной зоне накапливается NaCl. Возрастание осмотического давления приводит к появлению потока растворителя в мембрану и к возрастанию в ней гидростатического давления. В то же время увеличение концентрации соли вызывает сокращение молекул полиэлектролита, что также увеличивает давление. Когда это увеличение превзойдет осмотическое давление, поток растворителя изменит знак, и концентрация соли внутри мембраны увеличится еще больше. Возникнет градиент концентрации, соль покинет мембрану и будет вытекать после того, как мембрана достигнет максимального сокращения. Затем наступает релаксация, возвращение мембраны в исходное состояние, и процесс начинается снова.

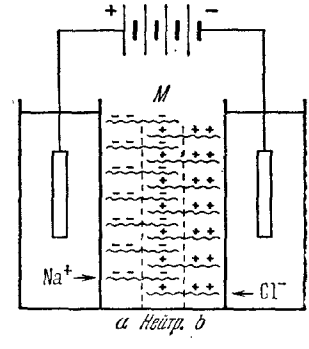


Рис. 16.13. Схема трехслойной полиэлектролитной мембраны

Мембранный осциллятор Теорелла (1955) состоит из двух ячеек, заполненных электролитом разной концентрации и разделенных мембраной из пористого стекла, содержащей связанные

отрицательные заряды. При пропускании постоянного тока создается разность потенциалов на двух сторонах мембраны и в ячейках возникает сдвиг уровней жидкостей. При сильных постоянных токах в системе происходят периодические колебания уровней жидкостей и мембранного потенциала. Вследствие наличия в мембране отрицательных зарядов электролит в ее порах несет преимущественно катионы. Внешнее поле заставляет перемещаться катионы и растворитель. Распределение концентраций в порах мембраны зависит от количества протекающей жидкости и скорости ее течения. В свою очередь, от этих факторов зависит сопротивление мембраны. Силы, действующие на систему, зависят от состояния системы. Возникают автоколебания, теория которых развита Тореллом (1964), Маркиным (1971) и другими.

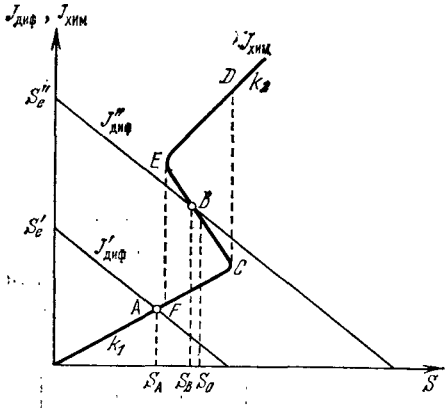


Рис. 16.14. Колебания концентрации в сопряженной хемиосмотической системе

В биологических мембранах, содержащих ферменты, обладающие кооперативными свойствами, периодические изменения состояния мембраны могут определяться нелинейной связью между транспортом вещества и химическими реакциями. Рассмотрим простой пример. Допустим, что фермент катализирует необратимый распад субстрата S. Химический поток (см. с. 309) равен

$$J_{хим} = v = -\frac{d_{хим}S}{dt} = kES, \qquad (16.19)$$

где S — концентрация субстрата, E — фермента, k — константа скорости. Допустим, что имеется критическая концентрация субстрата $S_{кр}$, при которой фермент испытывает кооперативные конформационные изменения, приводящие к повышению его активности. Константа скорости k возрастает с k_1 до k_2. Зависимость $J_{хим}(S)$ показана на рис. 16.14. Вследствие кооперативности $J_{хим}$ испытывает переход, подобный фазовому (ср. с. 505). Субстрат поступает в систему посредством диффузии через мембрану со скоростью

$$J_{диф} = \frac{d_{диф}S}{dt} = a(S_0 - S), \qquad (16.20)$$

где S_0 — концентрация S в источнике, которая практически постоянна. При $J_{хим} = J_{диф}$ скорость изменения концентрации $\dot{S} = -S_{хим} + S_{диф} = 0$ — система находится в стационарном состоянии. Рис. 16.14 показывает различие между двумя стационарны-

ми состояниями, отвечающими $S_0 = S_0'$ и $S_0 = S_0''$. Стационарное состояние, отвечающее точке A пересечения кривой $J_{\text{хим}}$ и прямой $J'_{\text{диф}}$, устойчиво, так как при малом положительном изменении концентрации субстрата $J_{\text{хим}} > J'_{\text{диф}}$ и концентрация субстрата убывает, пока система не вернется в точку A. При отрицательной флуктуации S поток $J'_{\text{диф}} > J_{\text{хим}}$ и S будет возрастать, пока система вновь не вернется в точку A. Напротив, если точка пересечения B с $J_{\text{хим}}$ и $J''_{\text{диф}}$ лежит в области кривой $J_{\text{хим}}$ с отрицательным наклоном, стационарное состояние B неустойчиво. Положительной флуктуации S отвечает $J''_{\text{диф}} > J_{\text{хим}}$ и S возрастает вплоть до точки C. В этой точке фермент испытывает конформационное превращение, система переходит в точку D, в которой $J_{\text{хим}} > J''_{\text{диф}}$. Концентрация субстрата S убывает до точки E, в которой фермент испытывает обратный переход в исходную форму, система переходит в точку F. Здесь S возрастает вновь, так как $J''_{\text{диф}} > J_{\text{хим}}$ и система вновь достигает точки C. Таким образом, система выходит на петлю гистерезиса $CDEF$, которой отвечает предельный цикл на фазовом портрете. Можно привести множество примеров такого рода поведения систем, сочетающих химические реакции и диффузию.

Особый интерес для биологии представляют возбудимые мембраны. Мы видели, что математическая модель нервной ткани выражается, в частности, *уравнениями Ходжкина — Хаксли* (с. 371). Это нелинейные уравнения четвертого порядка. Для целей качественного исследования можно, однако, понизить порядок нелинейности с четырех до двух путем исключения дифференциальных уравнений для быстрых компонент (см. с. 494). Одна из возможных упрощенных моделей второго порядка была получена и исследована Кринским и Иваницким.

В уравнениях Ходжкина — Хаксли медленными переменными являются n и h ($\tau_m \sim 10^{-4}$ с, $\tau_n \sim \tau_h \sim 2 \cdot 10^{-3}$ с). Вводим функции $\bar{m}(\varphi)$, $\bar{n}(\varphi)$, $\bar{h}(\varphi)$, выражающие установившиеся значения соответствующих переменных. Как показывает опыт, $\bar{n}(\varphi)$ и $\bar{h}(\varphi)$ связаны приближенным соотношением

$$\bar{n}(\varphi) + \bar{h}(\varphi) \approx q = \text{const} \ (\approx 0{,}85). \tag{16.21}$$

Упрощение уравнений Ходжкина — Хаксли достигается заменой m на $\bar{m}(\varphi)$, h на $q - n$. Тогда из исходных уравнений (11.5)—(11.9)

$$I = C\frac{\partial \varphi}{\partial t} + (\varphi - \varphi_{\text{K}})\,\bar{g}_{\text{K}} n^4 + (\varphi - \varphi_{\text{Na}})\,\bar{g}_{\text{Na}} m^3 h + (\varphi - \varphi_{\text{Y}})\,\bar{g}_{\text{Y}}, \tag{16.22}$$

$$\dot{m} = [\bar{m}(\varphi) - m]/\tau_m(\varphi),\ \dot{n} = [\bar{n}(\varphi) - n]/\tau_n(\varphi),\ \dot{h} = [\bar{h}(\varphi) - h]/\tau_h(\varphi)$$

получается система

$$I = \alpha C\frac{\partial \varphi}{\partial t} + (\varphi - \varphi_{\text{K}})\,\bar{g}_{\text{K}} n^4 + (\varphi - \varphi_{\text{Na}})\,\bar{g}_{\text{Na}} \bar{m}^3(\varphi)\,(q - n) + (\varphi - \varphi_{\text{Y}})\,\bar{g}_{\text{Y}}, \tag{16.23}$$

$$\dot{n} = [\bar{n}(\varphi) - n]/\tau_n(\varphi).$$

Параметр α оказывается равным 3. Уравнения (16.23) дают результаты, ма-

ло отличающиеся от тех, которые получаются при пользовании исходной моделью.

Качественное исследование модели с помощью фазового портрета проводится путем построения изоклин $\dot{n} = 0$ и $\dot{\varphi} = 0$, т. е.

$$n = \bar{n}(\varphi) \tag{16.24}$$

и

$$\bar{g}_K n^4(\varphi - \varphi_K) + \bar{g}_{Na}(q - n)\bar{m}^3(\varphi)(\varphi - \varphi_{Na}) + \bar{g}_Y(\varphi - \varphi_Y) - I = 0. \tag{16.25}$$

Последняя изоклина имеет N-образную форму на плоскости n, φ, что обеспечивает генерацию импульса. Особая точка на пересечении изоклин устойчива (рис. 16.15, *а*), что соответствует состоянию покоя мембраны. Спонтанная

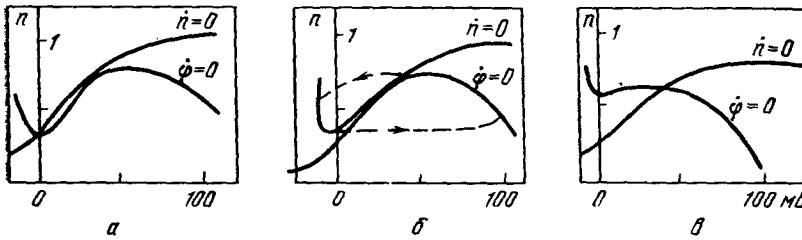


Рис. 16.15. Нуль-изоклины системы: покой (*а*), спонтанная активность (*б*), устойчивая деполяризация (*в*)

активность может быть вызвана увеличением проводимости $\bar{g}_{Na}$ или уменьшением $\bar{g}_K$. Она появляется, когда точка покоя теряет устойчивость, причем возникают предельный цикл и автоколебания (рис. 16.15, *б*). Неустойчивы особые точки, расположенные на средней ветви изоклины $\dot{\varphi} = 0$. Соответственно дальнейшее увеличение Na-тока (например, за счет сдвига $m(\varphi)$ на 20 мВ влево) приводит к исчезновению устойчивости деполяризации мембраны (рис. 16.15, *в*). Повторные периодические ответы возникают при таком значении внешнего тока I в (16.25), при котором особая точка оказывается в средней области $\dot{\varphi} = 0$. С помощью качественного анализа фазового портрета можно найти условия триггерного поведения мембраны. Аксон кальмара при некоторых экспериментальных условиях, например, при внутриклеточной перфузии CsF, ведет себя как триггер с двумя устойчивыми состояниями — раздражение током, направленным попеременно наружу и внутрь, приводит к перебросу из одного устойчивого состояния в другое.

Все изложенное показывает, что имеются основания трактовать изменения состояния возбудимой мембраны как фазовые переходы (см. § 15.5).

§ 16.5. Автоволновые процессы в сердечной мышце

Как мы видели (гл. 12), мышечная ткань также представляет собой *возбудимую среду*,— возбуждение, сообщаемое сетью нервных волокон, вызывает механохимические процессы. Тем самым процессы в возбудимых средах имеют важнейшее значение для физиологии, в частности, для физиологии сердечной мышцы.

Само понятие возбудимой среды как среды, в которой распространение импульса происходит без затухания за счет энергии,

запасенной в клетках, было введено Винером и Розенблютом (1946). Импульс генерируется каждой точкой среды. Примером одномерной возбудимой среды может служить нервное волокно. Каждая точка возбудимой среды может находиться в одном из трех состояний: *покоя*, *возбуждения* и *рефрактерности* (см.

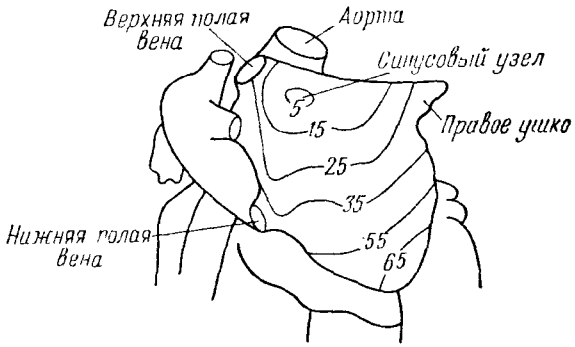


Рис. 16.16. Схема распространения волны по правому предсердию

с. 363). Если на малый участок волокна, находящийся в состоянии покоя, подать возбуждение, то он перейдет в возбужденное состояние, в котором пробудет время τ, затем перейдет в рефрактерное состояние с длительностью τ_R. В период рефрактерности τ_R участок не реагирует более на возбуждающий сигнал, следовательно, никакой участок не может возбуждаться с частотой, большей τ_R^{-1}.

В возбудимых средах реализуются автоволновые процессы, подобные описанным в § 16.2. Источники волн могут возникать и в таких средах, в которых ни один из элементов не способен возбуждаться самопроизвольно, т. е. не является автоколебательным. Возникновение таких источников связано с особыми свойствами среды и волны возбуждения.

На рис. 16.16 приведена схема распространения волны электрического возбуждения по правому предсердию. Показаны последовательные положения фронта волны; цифры указывают время в миллисекундах. Волна в норме испускается с частотой сердечного ритма порядка 1 Гц.

В норме автоволны в сердечной мышце синхронизированы. Синхронизация определяется подавлением быстрыми периодическими источниками всех более низкочастотных. При выходе ведущего центра — синусового узла — из строя вследствие инфаркта, работает наиболее быстрый запасный источник. Это один из примеров компенсации, о которой говорилось на с. 512.

Электрокардиограмма, электроэнцефалограмма дают информацию о распространении автоволн в соответствующих возбудимых средах.

При рассмотрении реакций Белоусова — Жаботинского мы встретились с источниками волн двух типов — с ведущими центрами (эхо), посылающими концентрические волны, и с реверберато́рами — вращающимися спиральными волнами (см. рис. 16.4 и 16.6). Возникновение и последующее размножение реверберато́ров играет важнейшую роль в механизме *фибрилляции* — весьма опасной сердечной аритмии (Кринский и Иваницкий). Аритмия означает нарушение синхронизации распространения волн

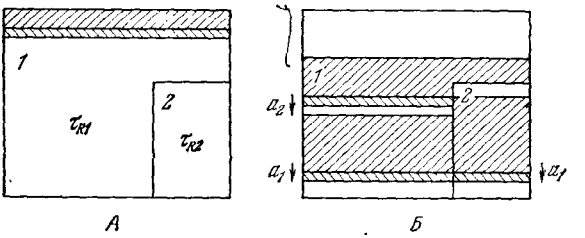


Рис. 16.17. Трансформация ритма в двумерной неоднородной среде: *А* — распределение рефрактерности ($\tau_{R1} > \tau_{R2}$), *Б* — разрыв фронта волны a_2

в сердечной мышце — вместо синхронных сокращений возникают беспорядочные колыхания и организм быстро погибает, если не проведена дефибрилляция.

Реверберато́р в однородной двумерной системе возникает, например, при наличии отверстия, периметр которого превышает длину волны $\lambda = v\tau_R$ (v — скорость распространения волны). Циркуляция волны возбуждения (реверберато́р) возможна и в непрерывной среде, неоднородной по рефрактерности. Если в некоторую область среды, имеющую форму кольца, послать импульс, то он не будет циркулировать, так как волны возбуждения, распространяющиеся по часовой стрелке и против нее, встретятся и погасят друг друга. Однако если рефрактерность не всюду одинакова, то циркуляция возникнет вследствие трансформации ритма.

На рис. 16.17 показана неоднородная среда, состоящая из двух областей с различающимися периодами рефрактерности τ_{R1} и τ_{R2}. Интервал Δt между двумя последовательными волнами a_1 и a_2 таков, что волна a_2 не может возбудить область с $\tau_{R2} > \tau_{R1}$. Возникает разрыв фронта волны a_2. Рефрактерный «хвост» имеет бо́льшую длину в области *2*, чем в *1*. Трансформация ритма состоит в выпадении второго импульса.

Реверберато́р возникает при контакте фронта волны с тканью, находящейся в состоянии покоя. Такая ситуация создается, например, встречной волной b (рис. 16.18, *а*). Волны a_1 и b гасят друг друга, и волна a_2 переходит в правую полуплоскость в виде полукруга (рис. 16.18, *в*), а затем, миновав свой «рефрактерный хвост», переходит в левую полуплоскость. Путь замыкается и образуется реверберато́р (рис. 16.18, *г*).

В однородной среде период волн, посылаемых ревербератором, равен τ_R, и ревербератор существует неограниченно долго. Если он возник на границе двух областей с различающимися τ_R, то его время жизни конечно и тем меньше, чем больше неоднородность.

Реверберераторы могут сами служить источниками волн высокой частоты, вызывающих появление новых реверберераторов.

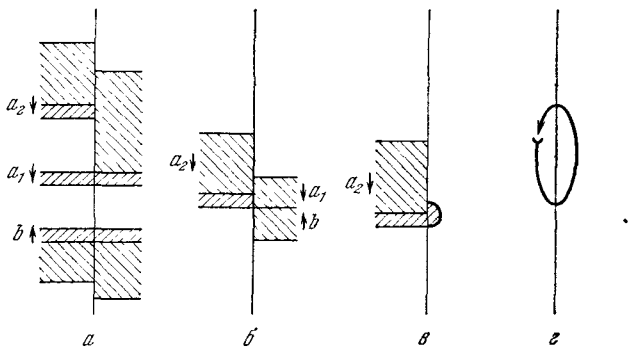


Рис. 16.18. Возникновение реверберератора в неоднородной среде: *а*, *б*, *в* — последовательные стадии, *г* — реверберератор

Иными словами, возможно размножение реверберераторов. В неоднородной среде реверберераторы посылают волны с различными частотами и не синхронизуются. Если новые источники волн рождаются чаще, чем исчезают старые, то наблюдается сложная картина, подобная фибрилляции.

Другой источник волн — *ведущие центры*, или *эхо*. Если подать несколько импульсов на неоднородное по рефрактерности волокно, то на неоднородности появляются новые импульсы, бегущие по волокну, и лишь позднее наступает состояние покоя. Возникшие импульсы подобны отраженным от неоднородности, которая рассматривается как источник эха. Показано, что эхо может появляться в средах, для которых $\tau/\tau_R > 0{,}5$. Реверберератор есть источник импульсов, который может существовать в среде и при $\tau/\tau_R > 0{,}5$. Пути, по которым возбуждение переходит из области с меньшим τ_R в область с бо́льшим τ_R и обратно, пространственно разделены, но сближаются при увеличении τ/τ_R и при $\tau/\tau_R = 0{,}5$ соединяются. Тем самым эхо есть реверберератор с предельной, нулевой длиной. Эхо и реверберератор сходны как источники импульсов и могут быть причинами фибрилляции в неоднородных возбудимых средах.

В электрофизиологии состояние сердечной ткани характеризуется так называемой *зоной уязвимости*. Уязвимость означает появление более чем двух ответов при подаче на полоску миокарда двух импульсов. Шириной зоны называется диапазон интервалов между импульсами Δt, при которых возникает уязви-

мость. Кринский показал, что уязвимость определяется параметром $\tau' = \tau/\tau_R$; ширина зоны тем меньше, чем меньше τ'.

В неоднородной возбудимой среде возникший источник волн, будь то эхо или ревербератор, может служить стимулятором для запуска новых источников волн. Если параметры среды таковы, что скорость «размножения» источников не меньше, чем скорость их «умирания», то возможна фибрилляция. При взаимодействии нескольких источников длительность фибрилляции быстро растет с увеличением τ'. Минимальное число источников, способное вызвать фибрилляцию данной длительности, уменьшается с увеличением τ'. Опыт показывает, что на полоске ткани миокарда фибрилляция может быть длительной, если размеры полоски достаточно велики, т. е. имеется некоторая *критическая масса* для фибрилляции. Число источников, обеспечивающее фибрилляцию, является аналогом критической массы.

Таким образом, безразмерный параметр τ' является важной характеристикой возбудимой среды, определяющей режим фибрилляции и время его существования.

Применительно к сердечной мышце нужно найти аналог величины τ, выражающий длительность возбужденного состояния, который можно измерить электрофизиологическими методами. В качестве такой величины вводится время возникновения ответа на подаваемый импульс, т. е. латентный период θ. Известно, что чем меньше амплитуда импульса, тем позже появляется ответ. Величина θ зависит от времени t, прошедшего после последнего возбуждения клетки к моменту прихода стимула. Существует максимальная задержка θ_{max}, т. е. ответ не появляется при подпороговой амплитуде импульса $A < A_{min}$ и при $t < t_{min}$. Таким образом, функция $\theta(t)$ описывает распространение возбуждения. Теоретический анализ показывает, что каждому значению θ отвечают два значения скорости распространения возбуждения. Бóльшая скорость характеризует устойчивый процесс «горения», меньшая — неустойчивый, «тление», не наблюдаемое при периодическом следовании импульсов в стационарном режиме. При увеличении частоты следования импульсов меньшая скорость возрастает, а бóльшая уменьшается. При дальнейшем повышении частоты обе скорости совпадают, режим становится нестационарным и происходит нарушение периодичности и выпадение импульсов.

Возникновение реверберaторов облегчается при увеличении параметра θ_{max}/τ_R. Если этот параметр больше 0,5, возможно возникновение источников эха.

Таким образом, уязвимость сердечной мышцы определяется величиною θ/τ_R. Применяемые в медицине антиаритмические вещества, дефибрилляторы, влияют именно на этот параметр. Важный для практики результат теоретического исследования состоит в том, что найдены физические критерии антиаритмогенных воздействий, которые могут изучаться на тканевых моделях путем определения их влияния на θ/τ_R. На тех же основаниях ис-

следуются факторы, вызывающие фибрилляцию. Действительно, удалось показать экспериментально, что вещества, уменьшающие θ/τ_R, обладают антиаритмическим действием, а вещества, увеличивающие θ/τ_R, способствуют возникновению сердечных аритмий, в соответствии с тем, что в моделях возбудимых сред уменьшение θ/τ_R затрудняет возникновение источников волн — эха и реверберато́ров.

Детальное количественное рассмотрение этих явлений проведено с помощью модели передачи возбуждения по системе электрически связанных клеток. Анализ поведения модели основан на методе фазовых портретов.

Теория фибрилляции сердечной мышцы, исходящая из общих положений физики нелинейных колебательных систем, является прекрасным примером биофизического исследования, доведенного до важных практических приложений. Задачи патофизиологии четко формулируются здесь как физические проблемы. Мы видим, что физический подход к физиологическим проблемам обеспечивает строгость и общность анализа, надежное обоснование получаемых выводов.

Глава 17

ПРОБЛЕМЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ

§ 17.1. Происхождение жизни

Мы обращаемся теперь к наиболее общим проблемам биологии и биофизики — к проблемам развития. Как уже говорилось, основные особенности живых организмов определяются их историчностью — каждый организм развивается онтогенетически и несет память о филогенетическом, эволюционном развитии. И онтогенез, и филогенез идут в направлении возрастающей сложности и представляют собой процессы возникновения и запоминания новой информации, а также, как мы увидим, возрастания ценности информации (§ 17.9). Добиологическая эволюция, приведшая к образованию биологических молекул, и биологическая эволюция должны рассматриваться как часть эволюции Вселенной.

Первый, исходный вопрос, с которым мы встречаемся в связи с проблемами развития,— это вопрос о происхождении жизни. Более ста лет назад Дарвин писал Гукеру (1863): «Пройдет еще немало времени, прежде чем мы сможем сами увидеть, как слизь или протоплазма или что-либо в этом роде породит живое существо. Я, однако, всегда сожалел, что пошел на поводу у общества и воспользовался заимствованным из Пятикнижия термином «сотворение», в результате которого путем каких-то нам совершенно неизвестных процессов «все и появилось». Рассуждать в настоящее время о возникновении жизни просто нелепо. С таким же успехом можно говорить о возникновении материи».

Позднее Дарвин уже не считал нелепым говорить о происхождении жизни и дал четкий ответ на вопрос о возможности возникновения жизни в наше время:

«Часто говорят, что условия для возникновения живых организмов существуют и теперь так же, как и всегда. Но даже если (о, какое оно большое это «если»!) мы смогли бы себе представить, что в некоем маленьком пруду со всяческими аммонийными и фосфорными солями, с достатком света, тепла, электричества и т. п. возникло белковое соединение, готовое к дальнейшим более сложным химическим превращениям, то сегодня это вещество было бы немедленно съедено или адсорбировано, чего не случилось бы, если бы живых существ еще не было» (1871).

Современные представления о происхождении жизни тесно связаны с результатами изучения геологической эволюции. Опа-

рин (1924) впервые развил теорию абиогенного происхождения жизни. Он предположил, что возникновению жизни предшествовала химическая эволюция. Позднее сходные взгляды высказал Холдейн (1928). Сейчас они общеприняты.

Примитивная атмосфера Земли была восстановительной. Водород является главным компонентом Солнца. Состав Солнца: H — 87, He — 12,9, O — 0,025, N — 0,02, C — 0,01%. Приведем для сравнения состав атмосферы Юпитера: H — 60, He — 36, $CH_4 \sim 1$, $NH_3 \sim 0{,}05\%$. Древнейшие метеориты содержат металлы в восстановленной форме. По оценке Миллера и Юри парциальное давление H_2 в архаической атмосфере Земли составляло $1{,}5 \cdot 10^{-3}$ атм, давление метана CH_4, возникающего при восстановлении углерода, составляло $4 \cdot 10^{-3}$ атм. Другими компонентами атмосферы были аммиак и вода. Эти вещества, а также формальдегид H_2CO обнаружены в космическом пространстве.

Современная атмосфера Земли содержит большое количество кислорода. Этого нет ни на какой другой планете Солнечной системы. Кислород мог возникнуть в результате фотодиссоциации воды под действием коротковолнового ультрафиолетового излучения Солнца и в результате фотосинтеза. Бютнер (1961) показала, что фотодиссоциация должна была дать ощутимые количества кислорода. Однако первичный атмосферный кислород расходовался на окисление металлов. Принято считать, что атмосферный кислород имеет в основном биогенное, фотосинтетическое происхождение. Точный баланс, однако, пока не подсчитан.

Таким образом, фотосинтезирующие организмы, *автотрофы*, должны были возникнуть на Земле в тот период, когда ее атмосфера была восстановительной. Более того, если бы клетки не достигли высоко организованного и защищенного состояния, кислород атмосферы не дал бы возможности развиваться жизни, окисляя химические соединения, из которых должны были образоваться биологически функциональные молекулы. Существование в наше время анаэробных бактерий, анаэробного гликолиза свидетельствует о возникновении жизни в восстановительной атмосфере. Таким образом, само существование жизни указывает на биогенное происхождение современной окисленной атмосферы Земли. Геология и биология тесно связаны.

Органические соединения должны были возникать в восстановительных условиях при наличии источников энергии. Такими источниками были ультрафиолетовое излучение Солнца, радиоактивное излучение Земли (прежде всего, β-распад ^{40}K), а также электрические разряды в атмосфере и тепло вулканов. Оценки количества энергии, сообщаемого Земле всеми этими источниками, приведены в табл. 17.1.

Возможность синтеза мономерных органических соединений в условиях, моделирующих условия на Земле, обладающей восстановительной атмосферой, доказана разнообразными опытами. Миллер (1955) пропускал тихие электрические разряды через

смеси метана, аммиака, водорода и паров воды. При этом образовывалась смесь ряда рацемических аминокислот и карбоксильных кислот, альдегидов и цианистого водорода HCN. Теренин (1958) получал органические вещества при облучении смеси CH_4, NH_3, H_2, H_2O коротковолновым ультрафиолетовым светом. Аминокислоты образуются и в термическом синтезе — при про-

Таблица 17.1. Возможные источники энергии для первичной химической эволюции (в кДж в год на м^2)

Полная солнечная радиация	10 900 000
Ультрафиолетовое излучение 300—250 нм	119 000
То же 250—200 нм	22 000
То же 200—150 нм	1 650
Ультрафиолетовое излучение <150 нм	71
Электрические разряды	
Коронные	126
Молнии	42
Естественная радиоактивность до глубины в 1 км $4 \cdot 10^9$ лет назад	117
Ударные волны и волны давления в атмосфере	46
Солнечный ветер	8
Вулканическое тепло	6
Космические лучи	0,06

пускании такой смеси через горячую трубку при температуре порядка 1000 °С. Аминокислоты образуются при бомбардировке смеси CH_4, NH_3 и H_2O в твердом состоянии электронами с энергией 5 МэВ. В этих условиях возникает и аденин. Аденин и гуанин образуются из HCN при ультрафиолетовом облучении. Из формальдегида образуются сахара, в том числе рибоза и дезоксирибоза. Нуклеозидтрифосфаты синтезируются при ультрафиолетовом облучении разбавленного раствора аденина, рибозы и фосфорной кислоты. В целом доказано, что мономеры информационных макромолекул белков и нуклеиновых кислот могли синтезироваться в первичной восстановительной атмосфере Земли. Источником пуринов и пиримидинов, а также порфиринов является HCN (см. с. 38). Аминокислоты и другие органические вещества обнаружены в древнейших скальных и осадочных породах и даже в метеоритах. На Луне таких веществ нет.

Мухин предположил, что источник энергии, необходимой для синтеза мономерных органических соединений,— подводные вулканы. Согласно табл. 17.1, вулканизм дает лишь малую долю энергии, используемой для синтеза первичной органики, если рассчитывать ее на всю поверхность Земли. Однако, если предположить, что синтез органики определяется локальными событиями, то роль вулканизма может оказаться весьма значительной. Следует иметь в виду, что число подводных вулканов много больше числа наземных. Мухин установил наличие HCN и орга-

ники в извергаемых вулканами веществах и продемонстрировал образование этих соединений в модельных опытах (1974).

Мы имеем все основания считать, что первой стадией добиологической эволюции был синтез мономерных органических соединений в условиях, далеких от равновесия. Следующая стадия должна была состоять в полимеризации и поликонденсации мономеров, в образовании полипептидных и полинуклеотидных цепей. Здесь возникает ряд проблем.

Во-первых, химическая система, способная к эволюции, т. е. к упорядоченному развитию, должна быть автокаталитической, обладать способностью к самовоспроизведению. Во-вторых, не любые макромолекулы могут быть предшественниками живых систем, но лишь те из них, которые обладают необходимыми информационными свойствами. Уже на этом этапе добиологического развития должны существовать селекционные механизмы. Как мы увидим, дарвиновская эволюция должна реализоваться уже на добиологической стадии развития. Общая проблема состоит в возникновении информации, в создании порядка из беспорядка.

В работах Фокса (1966—1968) экспериментально исследовалась самоорганизация в полипептидных цепях, образуемых при термической поликонденсации эквимолярных смесей 18 канонических аминокислот (кроме Асп и Глу) в присутствии солей фосфорной кислоты, игравших роль водоотнимающих средств. При этом образуются цепи неравномерного состава, синтетические полипептиды, названные Фоксом *протеиноидами*. Эти соединения обладают каталитической активностью, сходной с ферментативной; с их помощью удалось проводить реакции гидролиза, декарбоксилирования, аминирования и дезаминирования. Однако полимеразная активность у протеиноидов не обнаружена.

Протеиноиды способны образовывать *микросферы* при надлежащем подборе среды. Возникает *компартментация* протеиноидной системы, отделенной от раствора мембраноподобной оболочкой. Фокс считает такие микросферы добиологическими моделями клетки. Ранее Опарин предполагал, что компартментация первичных полимеров состояла в образовании *коацерватов*. Возникновение коацерватных капель — явление, известное в коллоидной химии, его сущность состоит в расслоении раствора и растворенного вещества. В этом смысле микросферы Фокса сходны с коацерватами Опарина. Так или иначе, на одной из ранних стадий добиологической эволюции должна была возникать компартментация.

После стадий образования мономеров и полимеров, после компартментации или одновременно с ней, как можно думать, возникало каталитическое взаимодействие полинуклеотидных и полипептидных систем. Переход к биологической эволюции связан, очевидно, с возникновением генетического кода.

Мы не располагаем пока возможностью экспериментального абиогенного создания живой системы. Мечта алхимиков — созда-

ние гомункулуса, искусственного человечка в колбе — далека от реализации. Но сегодня наука в состоянии построить содержательные физические модели добиологической и биологической эволюции.

§ 17.2. Моделирование добиологической эволюции

Изложим модельную *теорию самоорганизации макромолекул*, предложенную Эйгеном (1971).

Самоорганизация и *селекция* возможны, если абиогенная молекулярная система характеризуется метаболизмом, самовоспроизведением и мутабильностью. Это три необходимых условия. Метаболизм означает, что система является открытой, в ней происходит полимеризация и распад полимеров. Так как система далека от равновесия, эти два процесса не связаны условием микроскопической обратимости. Для поддержания метаболизма необходим приток вещества, обладающего избытком свободной энергии — в случае нуклеиновых кислот это нуклеозидтрифосфаты. Самовоспроизведение — матричное копирование полимера — означает автокаталитический процесс. Как было показано в главах 15 и 16, автокатализ может обеспечить самоорганизацию. Наконец, мутагенез необходим для создания новой информации.

Такая система может быть названа дарвиновской, если на нее наложены определенные ограничивающие условия, скажем, условие постоянной организации, т. е. постоянной суммарной концентрации энергизованных мономеров и суммарной концентрации полимеров всех сортов. Для такого постоянства должны быть подобраны надлежащие потоки мономеров и полимеров.

Против теории эволюции Дарвина выдвигалось возражение, казавшееся веским: естественный отбор означает выживание наиболее приспособленных. Но критерием приспособленности, адаптации, является выживание. Следовательно, теория Дарвина — порочный круг, тавтология — она говорит якобы о выживании выживающих.

В действительности критерии адаптации, которым отвечает наибольшее выживание потомства, вполне объективны, они определяются условиями среды. Так, например, обтекаемая форма тела акулы, дельфина или тюленя определяется адаптацией к водной среде. Этим, в свою очередь, создаются условия, обеспечивающие выживание и размножение. Роль внешних условий играют ограничения в модели Эйгена — условие постоянной организации или, в другом варианте, условие постоянных потоков.

Математическая модель Эйгена записывается следующим образом. Имеем n различных сортов полимеров, их концентрации x_i ($i = 1, 2, \ldots, n$). Каждый сорт обладает метаболизмом, способен к авторепродукции и мутагенезу. Кинетические уравнения имеют вид

$$\dot{x}_i = (A_i Q_i - D_i)\, x_i + \sum_{j \neq i} \varphi_{ij} x_j + \frac{\Phi_0 x_i}{\sum_{j=1}^{n} x_j}. \qquad (17.1)$$

Здесь $A_iQ_ix_i$ описывает образование полимера x_i путем автокопирования, D_ix_i — распад полимера. Метаболизм и авторепродукция содержатся в первом члене. Второй член описывает мутации — сорт полимеров i получает добавочные копии в результате соответствующих ошибок в сорте полимеров j. Наличие мутаций выражается также множителем Q_i — *фактором качества*. $Q_i = 1$ означает безошибочное копирование, $1 - Q_i$ есть мера ошибок. Соответственно справедлив закон сохранения

$$\sum_{l=1}^{n} A_l (1 - Q_l) x_l = \sum_{l=1}^{n} \sum_{j \neq l} \varphi_{lj} x_j. \tag{17.2}$$

Наконец, выражение (17.1) содержит общий поток Φ_0. Предполагается, что макромолекулы i пропорционально, т. е. как x_i/n, где $n = \sum_{j=1}^{n} x_j = \text{const}$, уходят из системы или добавляются в нее. Кроме того, может происходить разбавление в результате притока растворителя.

Таким образом, постоянство общей организации выражается условиями

$$A_iQ_i = \text{const}, \quad \sum_{j=1}^{n} x_j = n = \text{const}. \tag{17.3}$$

Сохранение ошибочных копий (17.2)

$$\sum_{l=1}^{n} A_l (1 - Q_l) x_l = \sum_{l=1}^{n} \sum_{j \neq l} \varphi_{lj} x_j.$$

Соответственно

$$\sum_{j=1}^{n} (A_j - D_j) x_j \equiv \sum_{j=1}^{n} E_j x_j = -\Phi_0, \tag{17.4}$$

так как $\sum \dot{x}_j = 0$. Поток Φ_0 компенсирует продукцию всех макромолекул. Уравнения (17.1) сводятся к уравнениям

$$\dot{x}_i = (W_i - \bar{E}(t)) x_i + \sum_{j \neq i} \varphi_{ij} x_j, \tag{17.5}$$

где

$$W_i = A_iQ_i - D_i \quad (\textit{селективная ценность}), \tag{17.6}$$

$$\bar{E}(t) = \sum_{j=1}^{n} E_j x_j \Big/ \sum_{j=1}^{n} x_j = -\frac{\Phi_0}{n} \quad (\textit{средняя продуктивность}). \tag{17.7}$$

Уравнения (17.5) неливейны, так как $\bar{E}(t)$ содержит все x_i. Этот член дает скользящий и саморегулируемый поток самоорганизации. Увеличивается число тех макромолекул, селективные ценности W_i которых выше порога $\bar{E}$, т. е. $W_i - \bar{E} > 0$. Увеличение их числа сдвигает порог $\bar{E}$ в сторону все больших значений, пока не будет достигнут оптимум $\bar{E}$, равный максимальной селективной ценности W_m всех имеющихся видов:

$$\bar{E} \to W_m. \tag{17.8}$$

Следовательно, система будет стремиться к состоянию «*селекционного равновесия*», являющемуся, однако, неустойчивым. Оно нарушится при появлении вследствие мутаций новой копии, обладающей более высокой селективной ценностью, т. е. отвечающей условию $W_{m+1} > W_m$. При этом система перейдет в новое состояние равновесия и т. д. Оптимизация такого рода может быть немонотонной, так как максимум селективной ценности W_m зависит от данного распределения концентраций x_i, характеризующего состояние среды.

Очевидно, что каждая мутация, ведущая к росту селективной ценности, отвечает отрицательной флуктуации производства энтропии — возрастанию упорядоченности, возрастанию информации. Это указывает на неустойчивость существующего стационарного состояния.

Итак, кинетические уравнения написаны, (17.5), надо их решить. Постараемся прежде всего понять качественно смысл модели Эйгена.

Систему, о которой идет речь, можно представить себе заключенной в ящик с полупроницаемыми стенками, через которые проходят мономеры и молекулы растворителя, но не полимеры. Внутри ящика происходит полимеризация, матричная репликация макромолекул и их распад. Макромолекулы с наибольшей селективной ценностью реплицируются быстрее всего, следовательно, их число в ящике должно нарастать за счет остальных макромолекул, которые «вымирают». Расчеты на ЭВМ полностью это подтверждают. На рис. 17.1 показано поведение четырех конкурирующих видов макромолекул с различными значениями W_i. «Выживают» лишь те цепи, у которых селективная ценность максимальна.

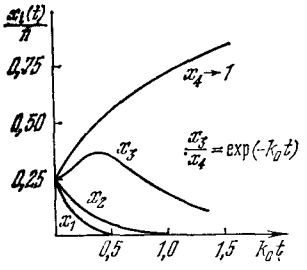


Рис. 17.1. Отбор в системе четырех конкурирующих видов: $W_1 = 1$, $W_2 = 4$, $W_3 = 9$, $W_4 = 10$

Уравнения (17.5) можно преобразовать к форме

$$\dot{\xi}_i(t) = (\lambda_i - \bar{E}(t))\xi_i(t), \tag{17.9}$$

где $\bar{E}(t)$ определено (17.7), ξ_i — «нормальные моды», представляющие собой линейные комбинации x_i. Имеем

$$n = \sum_{j=1}^{n} x_j = \sum_{l=1}^{n} \xi_l = \text{const} \tag{17.10}$$

и

$$\bar{E}(t) = \sum_{l=1}^{n} \lambda_l \xi_l(t)/n. \tag{17.11}$$

Решение системы (17.9) при $t \to \infty$ имеет следующие свойства. Все ξ_l, для которых $\lambda_l < \bar{E}(t)$, стремятся к нулю, непрерывно сдвигая порог для отбора $\bar{E}(t)$ в соответствии с (17.11), пока не останется лишь один «*квазивид*» (обычно «дикий тип» плюс распределение мутантов), характеризуемый максимальным собственным значением $\lambda_{\max}$. Отбор описывается экстремальным принципом

$$\bar{E}(t) \to \lambda_{\max}.$$

«Квазивид» отличается от «вида» с концентрацией x_m тем, что он содержит не только доминантную форму (*«главная копия»*), но и все ее мутанты — нормальная мода ξ_m, отвечающая $\lambda_{\max}$, есть линейная комбинация концентраций x_m и концентраций всех мутантов x_m. Вклад x_m в ξ_m является доминирующим.

Рассмотрим значение мутаций, фактор качества Q_i. Можно представить среднюю продуктивность (17.7) в виде

$$\bar{E} = \frac{1}{n}\left(E_m x_m + \sum_{l \neq m} E_l x_l\right) = \bar{E}_{l \neq m} + \frac{x_m}{n}\left(E_m - \bar{E}_{l \neq m}\right), \tag{17.12}$$

где

$$\overline{E}_{l\neq m} = \sum_{l\neq m} E_l x_l \Big/ \sum_{l\neq m} x_l = \sum_{l\neq m} E_l x_l/(n - x_m).$$

Условие селекционного равновесия $\overline{E} = W_m$ дает «равновесную долю» отобранного вида, т. е. его относительное выживание

$$\frac{x_m}{n} = \frac{W_m - \overline{E}_{l\neq m}}{E_m - \overline{E}_{l\neq m}}. \tag{17.13}$$

Стационарная доля ошибочных (мутировавших) цепей $1 - x_m/n$ пропорциональна $1 - Q_m$:

$$1 - \frac{x_m}{n} = \frac{E_m - W_m}{E_m - \overline{E}_{l\neq m}} = \frac{A_m - D_m - A_m Q_m + D_m}{E_m - \overline{E}_{l\neq m}} \equiv \frac{A_m(1 - Q_m)}{E_m - \overline{E}_{l\neq m}}. \tag{17.14}$$

При $Q_m = 1$ $x_m = n$, т. е. произошел бы полный отбор «главных копий», но дальнейшая эволюция прекратилась бы. Для эволюции необходимы мутации, т. е. значение Q_m, меньшее 1, но большее некоторого $Q_{\min}$. Значение $Q_{\min}$ находится из условия $x_m = 0$, т. е. согласно (17.13), $W_m = \overline{E}_{l\neq m}$. Имеем

$$1 > Q_m > Q_{\min} = \frac{D_m + \overline{E}_{l\neq m}}{A_m} = \varepsilon. \tag{17.15}$$

Фактор качества Q определяется точностью узнавания мономера при матричной редупликации. Если узнавание данного звена независимо от узнавания других звеньев, т. е. если нет кооперативности узнавания, то вероятность образования безошибочной копии, содержащей ν звеньев, есть

$$Q = q^{\nu}, \tag{17.16}$$

где q — вероятность точного воспроизведения одного звена. Сравнивая (17.16) с (17.15), находим

$$\nu_{\max} < \frac{\ln \varepsilon}{\ln q} \approx \frac{\ln \varepsilon}{1 - q}, \tag{17.17}$$

так как при q, близком к 1, $\ln q \approx 1 - q$. Неравенство (17.17) есть условие порога, устанавливающее верхний предел для количества информации, содержащегося в устойчивой саморепродуцирующейся системе.

§ 17.3. Игровые модели и информационные аспекты самоорганизации

Основная проблема, решаемая модельной теорией Эйгена,— это проблема возникновения упорядоченной структуры из исходного хаоса, проблема возникновения информации. Как мы видели, появление упорядоченности и ее отбор и поддержание возможны в открытой автокаталитической (матричной) системе, находящейся вдали от равновесия.

Случайную самоорганизацию хаоса и возникновение необратимой эволюции трудно себе представить. В самом деле, число различных полинуклеотидных цепей длиною в $\nu = 100$ звеньев, построенных из четырех нуклеотидов, равно $4^{100} \approx 10^{60}$. Случайный выбор цепи с определенной первичной структурой имеет ничтожную вероятность и, следовательно, не реализуем.

Не учитывая матричного автокопирования, даже очень крупные физики (Вигнер) приходили к выводу о невозможности добиологической самоорганизации, о ее противоречии основным положениям физики. Мы видим, что противоречие это кажущееся. В модельной системе Эйгена самоорганизация возможна. Поясним возникновение порядка из беспорядка с помощью игровых моделей.

Рассмотрим модель Эренфестов (1907). Имеется шахматная доска, на которой произвольным образом расположены черные и белые шашки, заполняющие все клетки. Имеем две октаэдрические кости, на одной из них указаны номера горизонтальных рядов $1, \ldots, 8$, на другой — буквы, указывающие вертикали, $a, \ldots, h$. Правило игры состоит в том, что, бросив обе кости, мы заменяем шашку, координаты которой получены при бросании, шашкой другого цвета. Результат игры не зависит от начального распределения: на доске через достаточное число бросаний будет примерно поровну черных и белых шашек. Число это, соответствующее одному поколению, равно 64. Игра Эренфестов моделирует установление равновесия. Распределение вероятностей оказывается гауссовым, с максимумом при $N/2 = 64/2$. В этой игре ярко проявляется ограничение флуктуаций. Если возникает отклонение от равновесного распределения, вероятность уменьшения этого отклонения возрастает пропорционально отклонению. Система является саморегулируемой в смысле возвращения к устойчивому равновесию. Это — общий закон поведения системы вблизи равновесия.

Изменим теперь правила игры: шашка, определяемая бросанием костей, не заменяется на шашку другого цвета, но удваивается за счет любой шашки другого цвета. В этом случае равномерное распределение неустойчиво — если начальному состоянию отвечали 32 белых и 32 черных шашки, то после примерно 64 бросаний на доске останутся шашки одного цвета. Случайное отклонение от равномерного распределения усиливается и определяет судьбу системы. В этой игре упорядоченность возникает из неупорядоченности, но не вследствие селекционного преимущества для одного из двух цветов, а вследствие случайного избытка популяции. Игра моделирует «выживание выживающих», но не дарвиновскую эволюцию (см. с. 538).

Третья игра моделирует поведение, промежуточное между устойчивым и неустойчивым. Это игра в «беспорядочное блуждание». На этот раз бросаем не кости, а монету. Если выходит герб — заменяем произвольную черную шашку на белую, если решка — наоборот. Неопределенность элементарного события может прямо повлиять на макроскопическое распределение. Система будет беспорядочно колебаться между крайними случаями (все шашки черные или все шашки белые).

Различие между тремя играми демонстрируется значениями вероятности для указанных крайних случаев. Заполнение доски только черными или только белыми шашками при беспорядочном

блуждании требует в среднем 32-х поколений ($32^2 \approx 1000$ бросаний), если исходное распределение было равномерным. Во второй игре такое состояние устанавливается через одно поколение (64 бросания). В игре Эренфестов для достижения крайнего состояния нужно около 10^{19} бросаний, так как вероятность такого состояния есть $(1/2)^{64} \approx 10^{-19}$.

В этих играх нет условий для отбора: метаболизма, самовоспроизведения (автокатализа) и мутаций. Эйген предлагает модельную *«игру в бисер»* для пояснения предложенной им теории.

Имеем четыре сорта стеклянных шариков, скажем, синих, желтых, красных и зеленых, расположенных на клетках шахматной доски. Считаем «рождение» и «смерть» независимыми процессами. «Смерть» моделируется игрой Эренфестов — шарик убирается с клетки, координаты которой выпали при бросании кости. Результат следующего бросания соответствует второй игре, т. е. моделирует «рожденне» — шарик выпавшей клетки удваивается, ему подобный помещается в клетку, освободившуюся при предыдущем бросании. «Смерть» и «рождение» чередуются, и общее число шариков остается неизменным (64). Введем теперь в игру селективные преимущества. Если бросание двух октаэдрических костей приводит к «рождению», то мы бросаем еще раз обычную кубическую кость и удваиваем синий шарик, если на этой кости выпало любое число очков; удваиваем красный, если выпало 1, 2, 3, 4, 5, но не 6 очков; удваиваем желтый, если выпало 1, 2, 3, 4 очка, и удваиваем зеленый, если выпало 1, 2, 3 очка. Таким образом, вероятность «размножения» для синих шариков наибольшая, для зеленых — наименьшая. Существенно, что в фазе «рождения» кости бросаются до тех пор, пока не станет возможным удвоение шариков. Это моделирует регуляцию посредством поддержания постоянным общего числа шариков.

«Игра в бисер» является моделью дарвиновской эволюции. Очевидно, что «выживать» будут в конечном счете лишь синие шарики — вся доска заполнится ими. Это показывают расчеты на ЭВМ. В этой игре нет, однако, мутаций. Для учета мутаций рассмотрим измененный вариант игры. Имеем лишь два сорта шариков — синие и желтые. Синие шарики удваиваются в 4 раза быстрее, чем желтые. Припишем синим шарикам определенную вероятность ошибочной репродукции — замены синего шарика на желтый. Желтые, напротив, размножаются без ошибок — вероятность возникновения синего шарика из желтого пренебрежимо мала. Расчеты для вероятностей ошибки 0, 25, 50 и 75% показывают, что в двух последних случаях синие шарики вымирают; при ошибке 25% их число в среднем превышает число желтых, но желтые не вымирают; и при точной репродукции синие быстро вытесняют желтые. Таким образом, имеется пороговое значение процента ошибок, при котором еще возможно преимущественное размножение синих шариков.

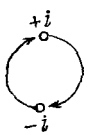
Возникновение упорядоченности в этих играх означает создание информации — запоминание случайного выбора на макроско-

пическом уровне (см. § 9.1). В модели Эйгена, описанной в § 17.2, мы имеем дело с выделением заранее имевшейся информации из маскировавших ее шумов и с созданием новой информации. Первый процесс моделируется наличием априорно максимальной селективной ценности у «главных копий», второй — возникновением новых «главных копий» в результате мутаций. Таким образом, оптимум $\bar{E} \to W_m$ означает выявление информации, сдвиг $W_m \to W_{m+1}$ — создание новой информации.

Выявленная и созданная информация остается в системе — система эту информацию «запоминает». Запоминание информации есть процесс неравновесный и необратимый. Мы видим, что развивающаяся система является и создателем, и рецептором информации — «запоминание» производится рецептором (см. § 17.9). «Запоминание» есть свойство диссипативной системы. Система, близкая к равновесию, «не помнит» случайные от него отклонения, флуктуации. Напротив, диссипативная система может обладать памятью именно в том смысле, что она способна запоминать случайный выбор — создавать и воспринимать информацию.

§ 17.4. Гиперциклы

Вернемся к модели Эйгена. Для того чтобы приблизить ее к природе, будем считать, что макромолекулы не автокопируются, но синтезируют комплементарные цепи. Система описывается чередованием «плюс»- и «минус»-копий ($+i$ и $-i$). Отбор происходит среди коллективов $\pm i$, представляемых циклами



Теория при этом не изменяется.

Естественный отбор среди таких циклов не может, однако, привести к возникновению отобранных длинных макромолекул. Во-первых, вероятность безошибочного включения мономера в полинуклеотидную цепь q (см. с. 541) не превышает 0,99. Следовательно, уже при $\nu = 100$ имеем $Q = q^{\nu} = (0{,}99)^{100} = 0{,}36$. Во-вторых, селективная ценность, выражаемая величиной W_i, не однозначно коррелирует с первичной структурой цепи. В цепи могут возникать мутации и матричный синтез может происходить с ошибками без того, чтобы параметр W_i изменился. Матричная редупликация основана на узнавании отдельных единиц и их ближайших соседей. Таким образом, например, двойная мутационная замена

$$\ldots CABBD \ldots CACBD \ldots \to \ldots CACBD \ldots CABBD \ldots$$

не должна сказываться на значении W_i, т. е. на скорости синтеза цепи как целого.

Двойная мутация, конечно, маловероятна. Единичная замена звена меняет W_i, но при большом числе звеньев ν это изменение очень мало. Относительное изменение скорости матричного синтеза при замене одного звена имеет порядок величины ν^{-1}. Допустим, что в результате замены селективная ценность W_i увеличилась на соответствующую малую величину. Отбор требует времени. Если за время преимущественного выживания главных копий появится вторая мутация, возвращающая W_i к прежнему значению, то новая главная копия не возникнет. Следовательно, величина W_i не выражает истинную *ценность информации* в случае простой или комплементарной репродукции.

Как бы ни были малы вероятности мутаций, через достаточное время в системе будут накапливаться цепи, вырожденные по значению W_m, но разнящиеся первичной структурой. Если цепи длинны, то число таких вырожденных макромолекул велико. В конечном счете наиболее вероятному состоянию системы будет соответствовать максимальное разнообразие первичных структур цепей с одинаковыми значениями W_m. Следовательно, селекционное равновесие не только неустойчиво, но неизбежно должно вырождаться.

Для эволюции макромолекул необходима автокаталитическая система, использующая информацию цепи, т. е. репродуцируемая путем узнавания не отдельных единиц, но первичной структуры цепи в целом или значительной ее части.

Все изложенное относилось к полинуклеотидным цепям. Мы видим, что сколько-нибудь длинные цепи (по оценке Эйгена с $\nu > 100$) сами по себе не эволюционируют.

Макромолекулы белка содержат *больший объем информации*, чем соответствующие полинуклеотиды, так как они обладают различными третичными (и четвертичными) структурами. Однако белки не способны к автокатализу, к саморепродукции. Они содержат большое количество информации, имеющей малую селективную ценность.

Эйген приходит к заключению об эволюционной необходимости автокаталитического гиперцикла, построенного из элементарных полинуклеотидных циклов $\pm i$ (с. 544) с каталитическим участием белков, синтезируемых с помощью этих же полинуклеотидов.

Рассмотрим последовательность реакций, в которой продукты каждой стадии подвергаются дальнейшему превращению. Если в такой последовательности какой-либо продукт совпадает с реагентом предшествующей стадии, система образует реакционный цикл, являющийся как целое катализатором. В сущности, мы уже имели дело с каталитическим циклом, рассматривая ферментативные реакции (рис. 17.2). Другой пример — цитратный цикл, или цикл Кребса (с. 424).

Каталитический гиперцикл Эйгена состоит из носителей информации — полинуклеотидных циклов I_1, I_2, ..., I_n, инструктирующих свою собственную репродукцию и трансляцию при син-

тезе ферментов E_j, которые выполняют роль полимераз — служат катализаторами для репродукции последующего посителя информации I_{j+1} (рис. 17.3).

В гиперциклах используется вся информация полинуклеотидных цепей или значительная ее часть. Гиперцикл обладает следующими свойствами:

1. Он обеспечивает устойчивое и контролируемое сосуществование всех видов, объединенных циклическими связями.
2. Он обеспечивает когерентный рост всех участников.
3. Гиперцикл конкурирует с любой отдельной репликативной единицей, не принадлежащей к циклу.
4. Гиперцикл может увеличиваться или уменьшаться, если это изменение дает селективное преимущество.
5. Гиперциклы могут соединяться в сети более высокого порядка.
6. Гиперциклы конкурируют друг с другом. Внутренние связи и кооперативные свойства гиперцикла могут развиться до оптимальной функции. «Фенотипические» преимущества, т. е. те вариации, которые дают прямое преимущество мутанту, немедленно стабилизуются. С другой стороны, «генотипические» преимущества, благоприятствующие возникновению последующего продукта, требуют пространственного разделения для конкурентной фиксации.

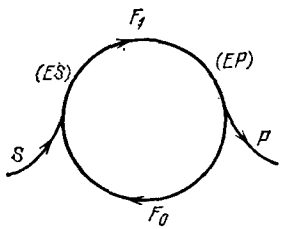


Рис. 17.2. Цикл в ферментативном процессе

Для гиперциклов селекционные преимущества всегда являются функциями численности популяции вследствие нелинейности. Поэтому гиперцикл, будучи однажды установленным, нелегко заменяется новым, так как новый вид всегда возникает в малом числе копий. Информация, зафиксированная в гиперцикле, нелегко утрачивается.

Эти свойства гиперциклов иллюстрируются модельными численными расчетами. Гиперциклы, содержащие достаточное число звеньев, характеризуются предельными циклами на фазовых портретах. Все компоненты гиперцикла сосуществуют, испытывая коррелированные нелинейные колебания. Этим обеспечивается взаимная стабилизация компонент.

Теория Эйгена была сопоставлена с опытами по «эволюции в пробирке» Шпигельмана (1965—1971) и Вейсманна (1976). В этих опытах изучались мутанты $Q\beta$-фага. Теория Эйгена хорошо моделирует их селекцию.

Как могли возникнуть гиперциклы — системы уже достаточно сложные? В сущности, это основной вопрос, относящийся к теории Эйгена. Согласно Эйгену и Шустеру, первая самовоспроизводящаяся структура с устойчивым содержанием информации — молекула типа тРНК, построенная из примерно 100 нуклеотидов,

Ранее (1972) это предположение было сделано Куном (см. § 17.5). Эти молекулы «пра-тРНК» отбирались как квазивид. Они были устойчивы к гидролизу, так как обладали не только вторичной, но и третичной структурой (с. 271). В этой структуре фиксировалась хиральность. Несколько таких молекул, обладающих сходными функциями, но различной специфичностью,

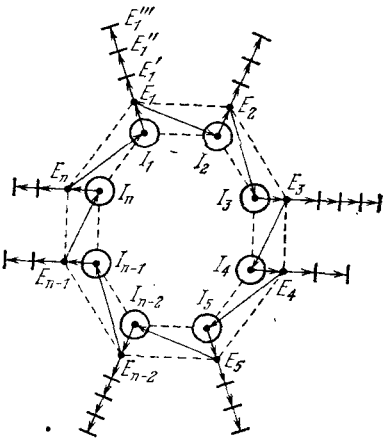


Рис. 17.3. Самоинструктируемый *каталитический гиперцикл*: I_j — носители информации, т. е. $\pm j$-циклы РНК; E_j — ферменты, кодируемые I_j и катализирующие образование носителей I_{j+1}; E_j', E_j'' — ферменты, катализирующие паразитные процессы

требовалось для построения системы трансляции. Такая система могла возникнуть из одного квазивида, но эквивалентные партнеры должны были развиваться одновременно. Это невозможно сделать, объединив такие молекулы в самовоспроизводимую макромолекулу большего размера, вследствие порога для ошибок. Это невозможно также сделать посредством компартментации из-за сильной конкуренции внутри компартмента. Следовательно, процесс требует установления функциональных связей между всеми единицами. Эти связи должны допускать конкуренцию с ошибочными копиями, иначе информация не могла бы сохраняться. Эти связи должны «выключать» конкуренцию между теми единицами, которые должны интегрироваться в новую функциональную систему, и обеспечивать их кооперацию. Наконец, интегрированная функциональная система должна с успехом конкурировать с любыми другими менее эффективными системами. Эти три требования могут быть выполнены лишь в гиперциклах.

На ранних стадиях эволюции, характеризуемых неточной репликацией и трансляцией и малым содержанием эффективно реплицируемых единиц, гиперциклическая организация дает существенные преимущества.

Эйген и Шустер предлагают конкретные модели для возникновения генетического кода. В частности, приводятся аргументы в пользу того, что началу трансляции способствуют первичные структуры, обогащенные ГЦ. Трансляция возникала благодаря достаточному содержанию протеиноидов — белковоподобных ве-

ществ (см. с. 537). Возникшая система трансляции могла далее улучшаться, но она уже не допускала новой трансляционной системы с альтернативной конфигурацией. Таким образом создавался и далее совершенствовался единый генетический код. Последующие стадии эволюции связаны с компартментацией и генетической рекомбинацией, причем фактор качества Q и максимальное количество звеньев в функциональных цепях ν_{max} возрастают в ходе эволюции.

Эти соображения разумны, но вопрос о возникновении гиперцикла, генетического кода, аппарата трансляции остается в теории Эйгена открытым. Мы не можем считать, что эти события произошли случайно, с очень малой вероятностью. Если бы это было так, то само возникновение жизни имело бы исчезающе малую вероятность. Мы ищем модельное истолкование добиологической и биологической эволюции, объясняющее их закономерное возникновение.

§ 17.5. Другие модели добиологической эволюции

Рассмотрим прежде всего термодинамические аспекты эволюции. Модель Эйгена, объясняющая отбор пра-тРНК с наибольшей селективной ценностью, описывает механизм флуктуационного уменьшения энтропии в диссипативной системе. Мутация,

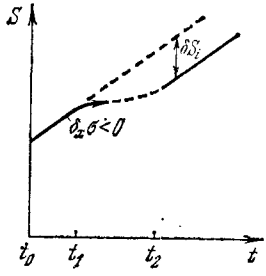


Рис. 17.4. Зависимость энтропии S от времени для процесса отбора при постоянных общих потоках мономерных единиц. В интервале t_0t_1 — стационарное состояние (σ = const); интервал t_1t_2 — область неустойчивости; при $t > t_2$ возникает новое стационарное состояние

отвечающая возрастанию селективной ценности, приводит к возрастанию упорядоченности. Это показано схематически на рис. 17.4.

В 1972 г. Кун предложил наглядную модель добиологической эволюции, непосредственно учитывающую суточную периодичность в состоянии среды. Такая периодичность означает периодическое изменение температуры и увлажнения — чередование растворения вещества и высыхания раствора. В начале образовывались сравнительно короткие полинуклеотидные цепи — пра-тРНК,— приобретающие третичную структуру. Периодическое изменение состояний среды действовало как фактор отбора — сохранялись те молекулы, которые не гидролизовались в стадии увлажнения. Отбирались цепи, способные к репликации. При этом возникала хиральность, знак которой определялся случайным начальным событием (см. с. 45).

Эти процессы разыгрывались на границе моря и суши, молекулы синтезировались в порах (компартментах) глинистых минералов, в которые проникали энергизованные мономеры. Периодичность состояния среды определяла чередование умножения молекул и их отбора, чередование конвергентной и дивергентной фаз. Далее происходило удлинение, т. е. усложнение цепей, причем на каждом этапе формы, способные к умножению, функционально связаны с условиями среды. Возникало ступенчатое расширение жизненного пространства.

Следующая фаза, по Куну, состояла в образовании ассоциатов из молекул пра-тРНК. Отбирались лишь те молекулы, которые структурно соответствовали друг другу. Возникало практически безошибочное умножение ассоциатов, несмотря на частые ошибки в отдельных молекулах. По существу, реализовался тот же прием, что и при промышленной сборке машин из отдельных деталей. Детали контролируются заранее, порознь, до сборки.

Кун подчеркивает важнейшее значение самосборки не только в современных живых системах, но и в добиологической эволюции.

Последующая эволюция, по Куну, состояла в возрастании независимости системы от весьма специфического окружения вследствие ее возрастающей сложности. Информационные аспекты возрастания сложности рассмотрены далее (§ 17.9). Это происходило опять-таки путем чередования дивергентных и конвергентных фаз. Конвергентная фаза означала уточнение имеющейся организации, дивергентная — перестройку системы и создание новой информации. В результате такой перестройки расширялось жизненное пространство. Ассоциаты увеличивались, проникали в более крупнопористые области. Далее они служили катализаторами (матрицами) для синтеза второго сорта макромолекул (белков), которые создавали компартменты, закупоривая поры в минералах и препятствуя диффузионному разделению матричных молекул. Создавалась обратная связь между полинуклеотидами, ответственными за синтез полипептидов, и этими полипептидами. Возникали мембраны, которые делали систему независимой. Возникал — в качестве побочного продукта эволюционного развития — генетический код. Соответственно появлялись примитивные ферменты.

Последующие стадии состояли в перестройке генетического аппарата — в разделении механизма репликации и механизма синтеза ферментов. Это привело к появлению третьего, наиболее позднего сорта макромолекул — полидезоксинуклеопротеидов (ДНК).

Такие системы, достигшие определенного уровня сложности, наталкиваются на границу генетически переносимого количества информации. Оно составляет около 10^7 бит. Оптимальное значение ошибки при репликации нуклеиновой кислоты — 10^{-6}. Это — системно-обусловленная граница. Ее преодоление было достигнуто в природе созданием пола и генетической рекомбина-

ции. Построение полового аппарата потребовало уже чрезвычайно рафинированных структурных элементов — своего рода взрывной эволюции органоидов клетки. В этом и состоял переход от прокариот к эукариотам. Переход скачкообразный (типа фазового!), так как не существует промежуточных систем.

В теории Куна предлагаются простые оценки времени, необходимого для последовательных фаз добиологической и биологической эволюции (см. § 17.6). Как мы видели, гиперцикл в этой модели образуется позже, чем мембраны.

Чернавская и Чернавский отмечают, что предположение о наличии специфических ферментативных (полимеразных) функций у случайно синтезированных полипептидов, фигурирующее в теории Эйгена и в теории Куна, неудовлетворительно. Такое предположение вводит в модель событие, вероятность которого чрезвычайно мала. Чернавские предлагают модель добиологической эволюции, отличную от описанных. Допускается возможность синтеза белка на молекуле полинуклеотида как на гетерогенном катализаторе. Самый способ такого синтеза предопределяет форму белковой молекулы и, тем самым, ее функцию.

Сборка на поверхности биспирального полинуклеотида формирует комплементарную структуру белка, образующую «чехол» полинуклеотида. Чехол может обладать репликазной функцией, если комплементарное соответствие между чехлом и ДНК (РНК) не полное и в комплексе возникает механически напряженная конформация. При этом важную роль может играть периодическое изменение внешних условий. Образующиеся нуклеопротеидные комплексы уже способны к авторепродукции, не дающей, однако, закрепления «положительных» признаков: на дочерней биспирали может синтезироваться оболочка, препятствующая репликации. Возможно, что в системе возникают первичные адапторы типа тРНК. При неполной комплементарности в комплексе наличествуют пустоты, в которые проникают молекулы, комплементарные, с одной стороны, к биспиралям, с другой,— к одним или нескольким аминокислотам. Адаптор обладает необходимой для этого конформационной гибкостью. Такой механизм может служить первичным механизмом трансляции, возникающим еще до образования универсального генетического кода.

Модель представлена в математической форме путем написания соответствующих (нелинейных) кинетических уравнений и исследования фазовых портретов.

Возникновение генетического кода может определяться двумя механизмами. Во-первых, в согласии с теорией Эйгена, возможно преимущественное выживание объектов с белковой оболочкой, обеспечивающей наибольшую скорость репликации. В результате такого отбора может возникнуть совокупность объектов с одинаковыми белковыми чехлами, но с различными последовательностями нуклеотидов. Одной последовательности аминокислот будет соответствовать несколько последовательностей нуклеотидов. Однако в этом случае эволюция может прекратиться в результа-

те «обратного вырождения». Возможно возникновение адапторов, комплементарных к одинаковым последовательностям нуклеотидов и к разным блокам аминокислот. Это приведет к ошибкам в синтезе белков. Согласно Чернавским, обратное вырождение преодолевается антагонистическими взаимодействиями. При взаимодействии молекул с различными последовательностями нуклеотидов могут перемешиваться наборы их адапторов. В результате нарушится синтез белка во встретившихся объектах и они оба погибнут, чего не произойдет при встрече тождественных объектов.

Учет антагонистических взаимодействий приводит к уравнениям

$$\frac{dx_i}{dt} = k_i x_i - x_i \sum_{\substack{j=1,\\ j\neq i}}^{n} a_{ij} x_j. \qquad (17.18)$$

Переменные x_i представляют численности или концентрации конкурирующих единиц, например гиперциклов Эйгена. Для одного из простейших случаев при $n = 2$ получаем

$$\frac{dx_1}{dt} = x_1(1 - x_2), \quad \frac{dx_2}{dt} = \frac{k_2}{k_1} x_2 \left(1 - \frac{k_1}{k_2} x_1\right). \qquad (17.19)$$

Фазовый портрет системы (17.19) при $k_2 = 2k_1$ приведен на рис. 17.5. Особая точка — седло — имеет координаты $x_1 = 2$, $x_2 = 1$, неустойчивый узел — координаты $x_1 = x_2 = 0$. В зависимости от начальных условий система будет стремиться к одному из двух устойчивых состояний: 1) $x_1 \to \infty$, $x_2 \to 0$ и 2) $x_1 \to 0$, $x_2 \to \infty$.

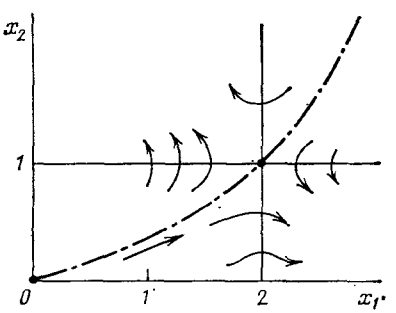


Рис. 17.5. Фазовый портрет системы (17.19)

Гольданский и Морозов предложили сходную модель эволюционного процесса, приводящего к асимметризации системы, т. е. к фиксации одного из хиральных изомеров (см. § 2.7). Если исходить из автокаталитической системы и взаимной деструкции хиральных D- и L-молекул при их взаимодействии, то получается отбор одного из вариантов. Динамическое уравнение «*хиральной поляризации*» имеет вид

$$\frac{d\eta}{d\tau} = \varepsilon(1 - \eta^2), \qquad (17.20)$$

где ε — фактор преимущества, равный

$$\varepsilon = (k_L - k_D)/(k_L + k_D),$$

k_L, k_D — константы скоростей для реакций оптических изомеров,

η — параметр «хиральной поляризации»:

$$\eta = ([L] - [D])/([L] + [D]),$$

$[L]$, $[D]$ — концентрации L- и D-молекул. Безразмерное время

$$\tau = {}^1/_2(k_L + k_D)t.$$

В работах Эбелинга и Фейстеля была предложена модель, объединяющая теорию Эйгена с представлениями о компартментах, о коацерватах, возникающих на ранней стадии эволюции.

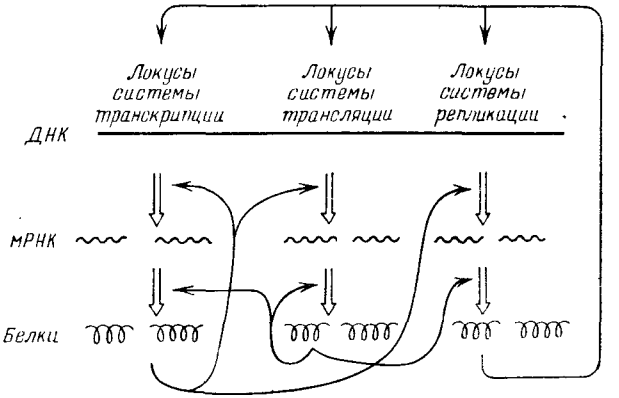


Рис. 17.6. Схема сайзера

Они образовывали химические микрореакторы, в которых и строились каталитические циклы и сети. Эволюция реализуется как результат конкуренции микрореакторов. Введение в рассмотрение пространственной неоднородности позволяет преодолеть трудности, связанные с возникновением гиперциклов. Микрореакторы играют роль «праклеток».

В более поздней работе тех же авторов добиологическая и биологическая эволюция посредством саморепродукции и мутаций рассматривается как автоволновой процесс в «пространстве фенотипов». Автоволна движется вследствие усиления посредством точной репродукции и распространения посредством репродукции ошибок, т. е. мутаций. Движение автоволны имеет скачкообразный характер. Теория процесса должна быть стохастической.

Идеи Эйгена модифицированы и дополнены в моделях *сайзеров* (Ратнер и Шамин, 1982). В гиперцикле фигурируют неуниверсальные процессы репликации, идущие с участием специализированных ферментов. В сайзерах единым образом учитываются возможности участия белков в репликации, транскрипции и трансляции, что показано схематически на рис. 17.6. Сайзеры обладают рядом преимуществ перед гиперциклами, совмещая одновременное выполнение следующих требований: способность к воспроизведению, замкнутость генетических процессов коллектива, структурная устойчивость, наличие широкого спектра дина-

мических свойств, подобных свойствам биологических систем, простота организации. Дальнейшие исследования таких моделей представляют очевидный интерес.

Кратко описанные здесь модели свидетельствуют о перспективности физических подходов к эволюции, основанных на идеях синергетики. Нельзя считать эти модели воспроизводящими реальные процессы добиологической эволюции. Они показывают, однако, что физико-математическое моделирование эволюции возможно. На основе этих моделей можно утверждать, что современная физика достаточна для понимания важнейших биологических явлений. Конечно, это лишь начальный этап построения теории, установления физических основ теоретической биологии.

§ 17.6. Биологическая эволюция

Биологическая эволюция представляет часть эволюции Вселенной. Биологическая эволюция локализована в ничтожно малой области мирового пространства — на Земле. Нет никаких данных о существовании жизни вне Земли. Напротив, протяженность биологической эволюции во времени соизмерима с временем существования Вселенной, оцениваемым величиной порядка $1{,}5 - 2 \cdot 10^{10}$ лет. Жизнь на Земле возникла около $3{,}9 \cdot 10^{9}$ лет назад. Возраст самой Земли оценивается в $4{,}5 \cdot 10^{9}$ лет. Мы уже говорили о принципиальном сходстве космической и биологической эволюции (§ 1.3).

Как могло хватить этого времени для создания столь сложной биосферы? Как могло хватить материала, поставляемого мутациями?

Современная теория эволюции, объединяющая теорию Дарвина с генетикой, отвечает на эти вопросы.

Теория Дарвина, принадлежащая к высшим достижениям научной мысли, исходит из следующих четырех положений (Майр).

1. Окружающий мир постоянно изменяется. Происходит вымирание видов и возникновение новых видов.

2. Эволюционный процесс непрерывен и постепенен, в нем нет скачков.

Первое положение безусловно, со вторым дело обстоит не так просто.

3. Родственные виды происходят от общего предка, что справедливо и для высших таксонов, вплоть до типов. В конечном счете все многоклеточные организмы произошли от одноклеточных, эукариоты от прокариот.

4. Эволюция происходит путем естественного отбора. Имеется наследственная изменчивость, значительная в каждом поколении. В результате борьбы за существование фиксируются организмы, наиболее приспособленные к условиям среды. В этом состоит механизм эволюции.

Материал для эволюции не ограничен. Природные популяции обладают громадным запасом изменчивости, имеющей преиму-

щественно скрытый характер, что определяется высокой степенью гетерозиготности. Средняя гетерозиготность у беспозвоночных 13,4%, у позвоночных 6,6%. Доля гамет дрозофилы, содержащих мутантные гены, достигает 25%. Разнообразие признаков, по которым идет отбор, определяется не единичными маловероятными мутациями, но изменчивостью, достигающей процентов и десятков процентов. Геном каждой особи возникает в результате случайной рекомбинации двух родительских геномов.

Эволюция укладывается в истекшие четыре миллиарда лет, так как она имеет направленный характер — естественный отбор, видообразование, макроэволюция происходят вследствие возникающих неустойчивостей предшествующих состояний. Однако мультистационарность любого такого состояния не означает, что популяция может изменяться в любом направлении. Эволюция канализована уже сложившимся устройством организма и ограниченными возможностями его изменения. Все наземные позвоночные имеют четыре конечности, потому что они произошли от кистеперых рыб, имевших четыре соответствующих члена. Путь эволюции до некоторой степени задан уже сделанными шагами. Филогенез неразрывно связан с онтогенезом.

Дарвин писал: «Мы ясно видим, что природа условий имеет подчиненное значение по сравнению с природой организма в определении каждой частной формы изменений,— может быть, не большее значение, чем природа искры, которой поджигается масса горючего вещества, имеет для определения природы пламени».

Сейчас начался процесс объединения теории эволюции с физикой, с кибернетикой, с теорией информации. Эволюция трактуется с позиций синергетики как явления самоорганизации в открытой системе, реализуемые за счет оттока энтропии в окружающую среду. Эволюцию можно рассматривать феноменологически как совокупность взаимодействующих *марковских процессов*. Цепи Маркова характеризуются стохастическими матрицами, элементы которых P_{ij} выражают вероятности появления признаков j, если в предыдущем звене (поколении) эти признаки были i. В эволюции происходит изменение матриц во времени. Направленность, определяемая уже сложившимся организмом, состоит в обращении большинства недиагональных членов матриц в нули.

Как уже отмечалось, самоорганизация в диссипативной системе имеет характер неравновесных фазовых переходов. По-видимому, это справедливо для видообразования и возникновения высших таксонов.

Образование новых видов означает появление двух или более репродуктивно изолированных популяций из исходной. Виды дискретны в этом смысле. Рассмотрим, следуя работе Белинцева и Волькенштейна, простейшую модель. Допустим, что исходный, дикий тип характеризуется аллелью А, мутант — аллелью В. Возможные генотипы потомства АА, АВ, ВВ. Им свойственны

разные коэффициенты приспособленности, которые мы обозначим w_1, w_2, w_3. Динамика частоты p гена A (частота гена B равна $1-p$), согласно основным положениям популяционной генетики, описывается уравнением

$$\frac{dp}{dt} = \psi(p) = p(1-p)\frac{(w_1-w_2)p+(w_2-w_3)(1-p)}{w_1p^2+2w_2p(1-p)+w_3(1-p)^2} - \mu p + \nu(1-p), \tag{17.21}$$

где μ — частота мутаций $A \to B$, ν — частота обратных мутаций $B \to A$. Время измеряется в числе поколений. При выводе (17.21) предполагается, что $\mu, \nu \ll 1$, $w_1 - w_2, w_2 - w_3 \ll w_3$. Перепишем уравнение (17.21) в виде

$$\frac{dp}{dt} = G^{-1}(p)(a_0 - a_1p - a_2p^2 - a_3p^3), \tag{17.22}$$

где

$$G(p) = w_1p^2 + 2w_2p(1-p) + w_3(1-p)^2 > 0,$$

$$a_0 = \nu w_1, \quad a_1 = \mu w_1 - \beta, \quad a_2 = \beta(3q-1)/q, \quad a_3 = \beta(1-2q)/q,$$

$$\beta = w_2 - w_3, \quad 0 < q = (w_2-w_3)/(w_1-w_2) < 1.$$

Предполагается, что $\beta \ll w_i$, $\nu \ll \mu$.

В стационарном состоянии $dp/dt = 0$ и

$$a_0 = \varphi(p) = a_1p + a_2p^2 + a_3p^3. \tag{17.23}$$

Изменению условий существования популяции отвечает изменение параметров β, q, μ, ν, от которых зависит темп эволюции и ее конечный результат. На рис. 17.7 приведена диаграмма стационарных состояний p при разных значениях β в случае $q < 1/3$ $(a_2 < 0,\ a_3 > 0)$ и $\beta < \mu w_1$ $(a_1 > 0)$. Кубическое уравнение (17.23) имеет три действительных положительных корня. Они совпадают в критической точке при $\beta = \beta_{кр}$. При $\beta < \beta_{кр}$ имеются три стационарных значения — устойчивые p_1 и p_2 и неустойчивое p_3. Стационарная система может пребывать в двух локально устойчивых состояниях, существенно разнящихся значениями p — частоты гена. Переход между этими состояниями подобен фазовому переходу первого рода. Ситуация, весьма сходная с рассмотренной в § 15.5. При $a_1 = 0$, т. е. при $\beta = \mu w_1$, получается переход, подобный фазовому переходу второго рода.

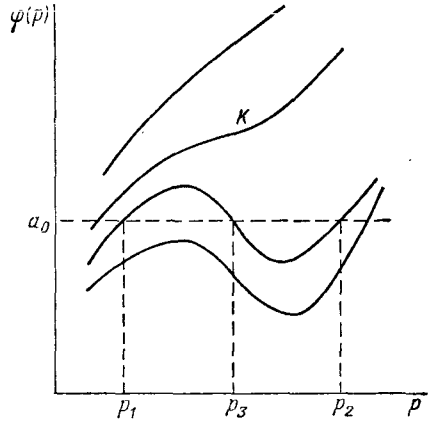


Рис. 17.7. Диаграмма стационарных состояний p

Рассматривая распределенную систему, включим в уравнение диффузию, т. е. миграцию особей:

$$\frac{\partial p}{\partial t} = \psi(p) + D\nabla^2 p. \qquad (17.24)$$

Коэффициент диффузии $D = \bar{r}^2/2$, где $\bar{r}$ — среднее расстояние, на которое мигрируют особи. Анализ этого уравнения показывает, что возможно появление устойчивого пространственно неоднородного распределения $p(r)$. Могут возникать две пространственно разделенные фазы, каждая из которых отвечает устойчивому состоянию. Это — простейшая модель аллопатрического видообразования.

Конечно, признаки вида не могут определяться мутированием одного гена. Описанная модель относится, однако, не к структурным, а к регуляторным генам, скажем, к генам гомеотическим.

Коротко рассказанная здесь работа требует дальнейшего развития. Однако уже сейчас имеются веские основания полагать, что видообразование имеет характер фазового перехода. Это положение снимает, по-видимому, противоречие между так называемыми градуализмом и пунктуализмом в эволюционной теории.

Дарвин считал видообразование постепенным, градуальным процессом. Отсутствие промежуточных форм в палеонтологической летописи объяснялось ее неполнотой. Однако в последующем столетии летопись эта чрезвычайно обогатилась. Были обнаружены практически непрерывные отложения, содержащие останки морских беспозвоночных. Выяснилось, что после длительного стазиса — неизменного состояния видов — за относительно короткое в геологическом масштабе время возникают новые виды и высшие таксоны. Эти факты легли в основу концепции *пунктуализма* (*punctuated equilibrium*), развитой Гулдом и Элдреджем. Ранее к сходным идеям пришел Северцов. Схема эволюционного процесса, предложенная им, показана на рис. 17.8. Так называемые *идиоадаптации* — приспособления группы к различным условиям, что приводит к распадению группы на некоторое число систематически подчиненных групп,— сменяются *ароморфозами* — более резкими прогрессивными изменениями признаков. На рис. 17.8 идиоадаптации изображены ветвлением эволюционного древа в плоскости, ароморфозы — подъемами (или спусками) на другие плоскости. Ароморфоз Северцова подобен фазовому переходу.

Палеонтологические исследования в разных случаях свидетельствуют как о медленных — градуальных,— так и об относительно быстрых — пунктуальных — переходах. Схемы градуализма и пунктуализма приведены на рис. 17.9. В сущности здесь нет противоречия. Констатировав фазовые переходы, мы остаемся в пределах термодинамики и не касаемся кинетики. Фазовый переход может происходить и быстро, и медленно, т. е. градуально. Физические модели этих процессов еще не построены.

Если новый вид возникает в результате фазового перехода, многие его признаки не являются адаптивными. Обычный вопрос «зачем?» оказывается лишенным смысла. Четвериков писал: «Систематика знает тысячи примеров, где виды различаются не

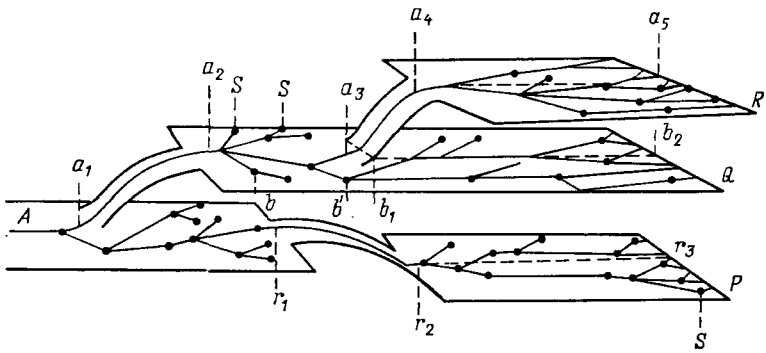


Рис. 17.8. Схема эволюционного процесса по Северцову

адаптивными, а безразличными (в биологическом смысле) признаками...».

Возможность пунктуального, скачкообразного видообразования, т. е. возможность фазового перехода, определяется динамикой генов, их регуляторными свойствами. В основе жизни лежит

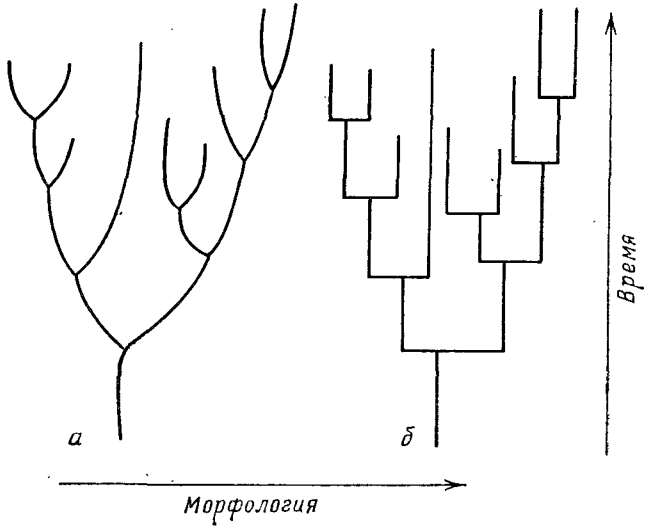


Рис. 17.9. Схемы градуальной (*а*) и пунктуальной (*б*) эволюции

поведение биологических макромолекул — нуклеиновых кислот и белков. Обратимся к рассмотрению их эволюции.

§ 17.7. Эволюция биологических макромолекул

В 1968 г. японский генетик Кимура, основываясь на данных популяционной генетики и на рассмотрении эволюционных древес для различных белков, предложил так называемую *нейтральную теорию молекулярной эволюции*. Мы уже говорили об этой теории в § 4.6.

Если скорость эволюции за год любого белка, т. е. скорость мутационных замещений аминокислотных остатков, выразить отношением числа замещенных аминокислотных остатков к одному

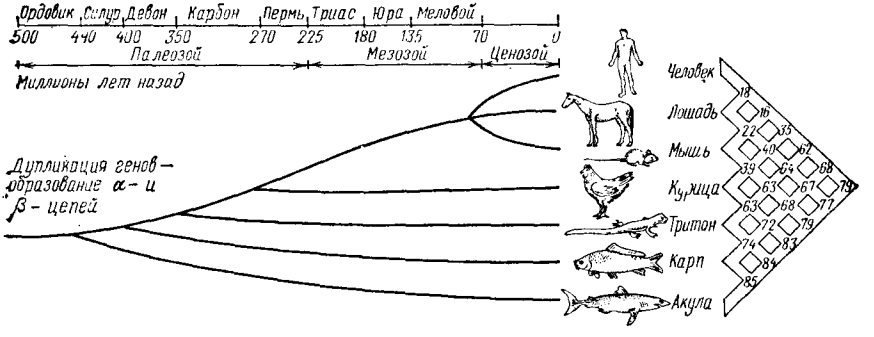


Рис. 17.10. Эволюционное древо гемоглобина позвоночных. Примерное постоянство чисел, выражающих отличия аминокислотных остатков на диагоналях, идущих снизу слева вверх вправо, свидетельствует о нейтральности замещений (Кимура)

остатку, эта величина оказывается примерно постоянной для различных эволюционных линий, пока функция и пространственная структура молекулы сохраняются. Скорость эволюции белка, таким образом, не зависит от размеров популяции. На рис. 17.10

Таблица 17.2. **Скорость замещений и 10^{-9} на один аминокислотный остаток в год**

Фибринопептиды	9,0	Инсулин	0,4
Иммуноглобулины	3,2	Цитохром *c*	0,3
Цепи гемоглобина	1,4	Гистон HIV	0,006
Трипсиноген	0,5		

показано для примера эволюционное древо α-цепи гемоглобина позвоночных. Справа указаны числа различий в аминокислотном составе этой цепи, содержащей 141 остаток. Из палеонтологии известно, сколько миллионов лет назад произошло то или иное разветвление древа. Примерное постоянство цифр на диагоналях, идущих слева снизу направо вверх, свидетельствует о примерном постоянстве скорости молекулярной эволюции.

Скорости эволюции различных белков сильно разнятся. В табл. 17.2 приведены некоторые данные.

При этом «активная часть» белка, т. е. активный центр фермента и его ближайшее окружение, эволюционирует на порядок медленнее, чем «пассивная» — остальная часть белка, т. е. каркас глобулы.

Эти факты свидетельствуют о случайности большей части мутационных замещений в белках, т. е. об их нейтральности. Такие замещения не подвергаются давлению естественного отбора.

Приведенные в табл. 17.2 цифры показывают, что если бы каждый остаток в белке был отобран с наблюдаемой скоростью, то времени существования Вселенной было бы недостаточно для создания белка, например α-цепи гемоглобина. В ней имеется 141 остаток. Скорость замещения (отбора?) $1{,}4 \cdot 10^{-9}$ в год, т. е. время замещения одного остатка составляет $0{,}7 \cdot 10^{9}$ лет. Для замещений 141 остатка нужно около 10^{11} лет.

Физический смысл нейтральной теории сводится к вырожденной корреляции первичной и пространственной структур белка и его биологической функции (ср. § 4.6).

Нейтральная теория показывает также, что мутации, приносящие малый вред, ведут себя как нейтральные, если абсолютное значение отрицательного коэффициента отбора

$$|s| < 1/N_{эф},$$

где $N_{эф}$ — эффективная численность популяции.

Максимальная скорость замещений (фибринопептиды в табл. 17.2) близка к скорости таких мутаций в ДНК.

Справедливость нейтральной теории следует из ряда фактов, относящихся к структуре биополимеров. Перечислим их.

1. Содержание аминокислотных остатков в белках в среднем примерно пропорционально числу кодонов для данного остатка.

2. Код обладает высокой помехоустойчивостью — мутации в кодонах примерно в $^2/_3$ случаев не меняют характера остатка — гидрофобный заменяется на гидрофобный же, гидрофильный — на гидрофильный (§ 8.6).

3. Молекула белка может рассматриваться как «отредактированный статистический сополимер» — каркас глобулы возникает случайно, естественный отбор «редактирует» активный центр и его ближайшее окружение (§ 4.6).

4. Искусственные, не имеющие отношения к эволюции белковоподобные вещества — протеиноиды Фокса (с. 537) — обладают ферментативной активностью. В сочетании с ионами Zn^{2+} они могут оказаться полимеразами, с ионами Fe^{2+} и Cu^{2+} — участниками окислительно-восстановительных процессов.

5. Благодаря «допускам», «люфтам», в устройстве химической машины организма имеются разнообразные возможности компенсации вредных мутаций на метаболическом или генном уровне. Приведем простейший пример. Допустим, что мутантный фермент участвует в некоторой метаболической цепи, обеспечивая скорость v' производства промежуточного продукта, меньшую чем скорость v для дикого типа. Справедлива кинетика

Михаэлиса — Ментен. Имеем (ср. с. 178)

$$v = k_1 k_2 ES/(k_2 + k_{-1} + k_1 S). \qquad (17.25)$$

Если уменьшение скорости до v' определяется уменьшением k_2 до $k_2 - \Delta k$, имеем при $\Delta k \ll k_2$

$$v' \approx v - \Delta k \frac{k_1 ES\,(k_{-1} + k_1 S)}{(k_2 + k_{-1} + k_1 S)^2}. \qquad (17.26)$$

Простейшая компенсация, обеспечиваемая обратными связями, состоит в увеличении количества фермента, $E \to E + \Delta E$. Имеем

$$v'' \approx v + \Delta E \frac{k_1 k_2 S}{k_2 + k_{-1} + k_1 S}. \qquad (17.27)$$

Полная компенсация реализуется, если

$$v'' - v = v - v',$$

т. е.

$$\frac{\Delta E}{E} \approx \frac{\Delta k}{k_2}\left(1 + \frac{k_2}{k_{-1} + k_1 S}\right)^{-1}. \qquad (17.28)$$

Компенсированные вредные мутации ведут себя как нейтральные.

Таким образом, точность первичной структуры белка не имеет определяющего значения для видообразования. Самоорганизация глобулы происходит автоматически, «редактированию», т. е. отбору, подвергается лишь ее активная часть. Медленность замещений в гистоне HIV (табл. 17.2) свидетельствует о том, что здесь вся молекула функциональна, активна. Действительно, в хромосоме гистон взаимодействует как с ДНК, так и с другими гистонами.

Конечно, не могут быть нейтральными мутации, резко изменяющие характер остатка, скажем, замена кислотного остатка 6 Глу на нейтральный Вал в β-цепи человеческого гемоглобина, что приводит к серповидноклеточной анемии.

Все сказанное справедливо и для нуклеиновых кислот, как о том свидетельствует «игра в клеверный лист» Эйгена (с. 271) и изучение многих замен в различных видах РНК (Эбель).

Второстепенное значение точной первичной структуры белка для вида непосредственно доказывается сопоставлением 44-х белков человека и шимпанзе. Оказалось, что различия в аминокислотном составе этих белков не превышают 1%. Чем же определяется на молекулярном уровне различие видов?

Мы все время обсуждаем вопросы, относящиеся к структуре белков. Наряду со структурой необходимы точные ответы на три вопроса: сколько, когда и где? Сколько производится данного белка в организме, на какой стадии онтогенетического развития, в каких клетках и тканях? Иными словами, определяющее значение имеет регуляция синтеза белков, о которой шла речь в § 8.8. Мутации регуляторных генов, мутации, нарушающие ди-

намику генов, по-видимому, не могут быть нейтральными. Сейчас мы слишком мало об этом знаем.

Нейтрализм на молекулярном уровне непосредственно связан с рассмотренными в предыдущем параграфе пунктуализмом и неадаптационизмом. Точечные замены в белках градуальны — белок изменяется звено за звеном, а не как целое. Следовательно, эти замены не пунктуальны и не имеют значения для видообразования. Нейтральность следует из пунктуализма, и наоборот. То же относится к неадантационизму — нейтральные мутации в биополимерах не адаптивны.

Нейтральная теория никак не противоречит теории Дарвина, которая рассматривает эволюцию фенотипов, а не молекул.

§ 17.8. Информационные аспекты эволюции

В ходе эволюции происходит возрастание количества информации. Информация возрастает либо путем ее выделения из маскирующего шума, либо путем создания новой информации в результате запоминания случайного выбора (Кастлер).

Фазовое пространство информационной системы содержит устойчивые и неустойчивые области. Первым соответствует информация, вторым — энтропия. В термодинамическом процессе информация может возрастать (скажем, при кристаллизации жидкости), но это не новая, а известная *a priori* информация, ранее скрытая «энтропийным шумом». Для возникновения информации необходима мультистационарность, возможность выбора одного из нескольких устойчивых состояний. Такая система является уже не термодинамической, но диссипативной. Выбор состояния имеет характер неравновесного фазового перехода. В ходе эволюции возникновение новой информации определяется «запоминанием» мутаций и генетических рекомбинаций. Новая информация создается при появлении на свет каждой новой особи. Новая информация создается при возникновении нового вида и высшего таксона.

Шмальгаузен впервые перевел теорию эволюции на информационный язык. Биогеоценоз получает информацию о состоянии популяции посредством обратных связей и, тем самым, «включает в себя специфический механизм преобразования этой информации в управляющие сигналы и средства передачи последних на популяцию». Соответствующая схема показана на рис. 17.11. Генетическая информация передается от поколения к поколению только после ее преобразования в биогеоценозе, частью которого является сама популяция.

Однако Шмальгаузен подчеркивал, что для эволюции существенно не количество, а *качество*, или *ценность информации*. «Во всех случаях, когда производится сравнение и отбор информации, это происходит на основе их оценки по качеству...».

Как определить ценность информации?

В качестве меры ценности может быть принята величина

$$V = \log_2(P/P_0), \qquad (17.29)$$

где P_0 и P — вероятности достижения некоторой цели до и после получения информации. Формула (17.29) близка к предположению Харкевича.

Поскольку здесь фигурирует понятие «цели», очевидно, что это определение, в отличие от определения количества информации, не универсально — «цели» у разных рецепторных систем

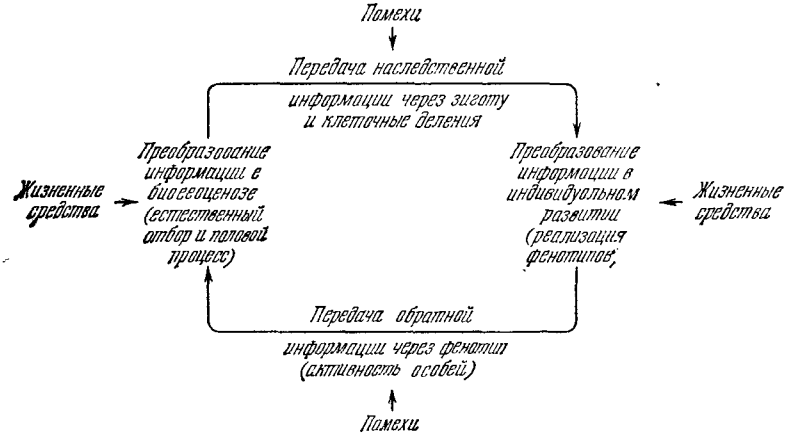


Рис. 17.11. Общая схема регулирующего механизма эволюции по Шмальгаузену

различны, и то, что ценно для одной системы, может не иметь никакой ценности для другой. Таким образом, ценность информации связана с ее рецепцией. Говоря об информации в § 9.1, мы рецепции не касались. Предполагалось лишь, что рецептор умеет отличить одну букву от другой. Рецепция информации есть неравновесный и необратимый процесс перехода рецепторной системы из неустойчивого в одно из возможных устойчивых состояний. Наличие «цели» означает наличие неустойчивости и выбор результирующего состояния. При этом в рецепторе возникает новая информация — происходит запоминание полученного сообщения. В зависимости от запаса уже имеющейся информации система характеризуется тем или иным уровнем рецепции. Для чтения стихов Пушкина нужно по меньшей мере знать русский язык.

На данном уровне рецепции ценностью обладает лишь неизбыточная, новая информация. *Избыточной* называется повторная информация, передача которой уменьшает вероятность разрушения информации шумом. Далее вместо того, чтобы пользоваться формулой (17.29), мы будем считать мерой ценности неизбыточность, т. е. незаменимость сообщения.

Допустим, что имеется текст, написанный по-русски. Зная лишь число букв в алфавите, мы находим количество информации, приходящееся на одну букву:

$$I_1 = \log_2 32 = 5 \text{ бит}.$$

На следующем уровне рецепции нам известны вероятности появления букв p_i. Для вычисления I_2 следует пользоваться формулой Шеннона (с. 303)

$$I_2 = -\sum_{i=1}^{32} p_i \log_2 p_i = 4{,}35 \text{ бит}.$$

На втором уровне сообщение обладает избыточностью

$$R_2 = 1 - I_2/I_1 = 0{,}13.$$

На следующих уровнях рецепции учитываются двойные, тройные и т. д. корреляции букв.

Избыточность

$$R_j = 1 - I_j/I_1. \qquad (17.30)$$

Для русского языка информации и избыточности равны

I_1	I_2	I_3	I_4 ...
5,00	4,35	3,51	3,01 ... бит
R_1	R_2	R_3	R_4 ...
0	0,13	0,30	0,40 ...

На четвертом уровне 40% букв избыточно. Это значит, что для понимания текста достаточно 60% случайно распределенных букв сообщения. Возрастание избыточности означает возрастание неизбыточности, т. е. ценности, незаменимости, неизбыточности букв.

Шредингер назвал организм апериодическим кристаллом. Информационный смысл этих слов состоит в том, что апериодическая система содержит гораздо большее количество ценной информации, чем эквивалентная периодическая система, характеризуемая большой избыточностью.

Определяя ценность информации как степень неизбыточности, будем рассуждать следующим образом. Допустим, что сообщение содержит N_1 «букв» и количество информации $N_1 I_1$. На j-м уровне рецепции полученная информация уменьшится до $N_1 I_j$. Заменим уменьшение информации с I_1 до I_j уменьшением числа букв в сообщении с N_1 до N_j, что эквивалентно пренебрежению избыточными буквами. Общую информацию считаем постоянной. Тогда

$$N_j/N_1 = I_j/I_1 = 1 - R_j.$$

Соответственно возросшая относительная ценность информации

равна I_1/I_j или $(1 - R_j)^{-1}$. Для русского языка

V_1	V_2	V_3	V_4 ...
1,00	1,15	1,43	1,67 ...

На этой основе рассмотрим рецепцию генетической информации, содержащейся в ДНК. На первом уровне количество информации в цепи, содержащей n нуклеотидов, равно

$$I_1 = \log_2 4^n = 2n \text{ бит.}$$

«Целью» является синтез белка. Количество информации в синтезированной белковой цепи равно

$$I_2 = \log_2 20^{n/3} = 1{,}44n \text{ бит.}$$

Избыточность, определяемая вырождением кода, равна $R_2 = 1 - I_2/I_1 = 0{,}28$. На следующем уровне учтем нейтральность мутаций — возможность замены ряда аминокислотных остатков родственными им без изменения свойств белка.

Число незаменимых остатков $N < 20$. Имеем

$$I_3 = \log_2 N^{n/3} < I_2.$$

На четвертом уровне учтем возможность замены белка как целого, например протеазы. Если в системе фигурируют цепи, ДНК двух сортов, содержащие n_1 и n_2 звеньев, синтезируются два белка с $n_1/3$ и $n_2/3$ звеньями. Пусть $n_1 = 0{,}75n_2$, $N = 8$ для обоих белков. Тогда

$$I_1 = 2n_1 + 2n_2 = 4{,}67n_1 \text{ бит,}$$

$$I_2 = 1{,}44n_1 + 1{,}44n_2 = 3{,}36n_1 \text{ бит,}$$

$$I_3 = n_1 + n_2 = 2{,}33n_1 \text{ бит,}$$

$$I_4 = n_1 \text{ бит.}$$

Избыточности равны 0,28, 0,50, 0,79, относительные ценности 1,00, 1,40, 2,00, 4,80.

Условные ценности кодонов ДНК можно определить по степени незаменимости кодируемых ими аминокислотных остатков. Бачинский установил значения функциональной близости аминокислотных остатков (ФБА), характеризующие их взаимозаменяемость:

$$\text{ФБА} = 2N_{ij}/(N_i + N_j),$$

где N_{ij} — числа позиций в изофункциональных белках, в которых у одних белков находится аминокислота i, у других — j; N_i, N_j — встречаемости остатков. Соответствующая таблица построена. Условные ценности кодонов определяются по результатам их точечных мутаций. Имеется, например, кодон ААА, кодирующий Лиз. Мутационные замещения и отвечающие им значения ФБА

имеют вид

ЦАА Лиз — Гли 18	АЦА Лиз — Тре 19	ААЦ Лиз — АсН 17
ГАА Лиз — Глу 17	АГА Лиз — Арг 25	ААГ Лиз — Лиз 100
УАА Лиз — Терм 4	АУА Лиз — Иле 5	ААУ Лиз — Асн 17

Тихой мутации ААА — ААГ приписываем произвольно ФБА = 100. Суммируем полученные значения и делим сумму на 300. Получаем условную величину q, тем большую, чем больше

Таблица 17.3. **Ценности кодонов** xyz

x \ y	А	Ц	Г	У	z
А	Лиз 0,81 Асн 0,79 Лиз 0,81 Асн 0,79	Тре 0,55 0,55 0,57 0,55	Арг 0,70 Сер 0,80 Арг 0,70 Сер 0,80	Иле 0,64 Иле 0,65 Мет 1,25 Иле 0,65	А Ц Г У
Ц	Гли 0,86 Гис 0,94 Гли 0,86 Гис 0,94	Про 0,60 0,61 0,60 0,61	Арг 0,51 0,61 0,51 0,61	Лей 0,49 0,57 0,50 0,57	А Ц Г У
Г	Глу 0,76 Асп 0,77 Глу 0,76 Асп 0,77	Ала 0,52 0,52 0,52 0,52	Гли 0,57 0,55 0,57 0,55	Вал 0,53 0,54 0,55 0,54	А Ц Г У
У	Терм Тир 0,98 Терм Тир 0,98	Сер 0,56 0,56 0,54 0,56	Терм Цис 1,12 Трп 1,82 Цис 1,12	Лей 0,68 Фен 0,86 Лей 0,69 Фен 0,86	А Ц Г У

взаимозаменяемость остатков. Для ААА $q = 0{,}74$. Степень незаменимости, условную ценность, представим как

$$v = (q + 0{,}5)^{-1}.$$

Для ААА $v = 0{,}81$. В табл. 17.3 указаны эти условные значения.

Ценности совместно вырожденных кодонов могут заметно различаться. Проводя усреднение по всем совместно вырожденным кодонам, находим условные ценности аминокислотных остатков, характеризующие степень их заменимости (табл. 17.4). Наиболее ценен и, соответственно, незаменим остаток Трп. Как мы видели, это справедливо и для терминальных мутаций.

Биологическое развитие — как онтогенез, так и филогенез — идет в направлении возрастающей сложности биологической системы. Увеличение сложности означает увеличение числа разно-

родных элементов системы и связей между ними. Возрастает незаменимость элементов системы и, значит, ценность информации.

О возрастании ценности информации в биологическом развитии свидетельствует ряд фактов. Рекапитуляция означает возрастание незаменимости информации в эмбриогенезе. На ранних

Таблица 17.4. **Ценности аминокислотных остатков в белках**

Остаток	v	Остаток	v	Остаток	v
1. Трп	1,82	8. Лиз	0,81	15. Про.	0,60
2. Мет	1,25	9. Асн	0,79	16. Лей	0,58
3. Цис	1,12	10. Асп	0,77	17. Гли	0,56
4. Тир	0,98	11. Глу	0,76	18. Тре	0,55
5. Гис	0,94	12. Иле	0,65	19. Вал	0,54
6. Глн	0,86	13. Сер	0,64	20. Ала	0,52
7. Фен	0,86	14. Арг	0,61		

стадиях онтогенеза это проявляется очень ярко. Определенный участок бластулы или ранней гаструлы тритона ответствен за образование глаза. Этот участок — *презумптивный глаз*. Если его пересадить в зародыш, находящийся на более поздней стадии развития, судьба презумптивного глаза будет зависеть от места пересадки — на голове хозяина он может образовать мозг или глаз, в других областях зародыша — те органы и ткани, которые характерны для этих областей при нормальном развитии. На стадии нейрулы презумптивный глаз становится *детерминированным глазом* — соответствующий участок образует глаз при пересадке в любой локус зародыша. *Тотипотентность* заменяется *унипотентностью* в ходе развития, т. е. возрастает незаменимость. Сходные процессы происходят при филогенезе, при видообразовании.

Незаменимость элемента системы может означать уменьшение ее приспособленности — выход из строя незаменимого элемента может привести организм к гибели, так как функция этого элемента не может быть реализована другим. Однако возрастание сложности системы вследствие роста незаменимости ее элементов делает организм более автономным и, тем самым, увеличивает его приспособленность.

Можно думать, что при биологическом развитии должна возрастать ценность информации, т. е. незаменимость элементов сообщения уже на простейшем молекулярном уровне структуры. Воспользуемся значениями v табл. 17.4 и вычислим разности суммарных ценностей цитохромов *с* ряда организмов (табл. 17.5).

Эти данные дают некоторые основания думать, что ценность белковой цепи возрастает в ходе филогенеза. Конечно, нельзя считать, что состав цитохрома *с* может отражать большее совершенство человеческого мозга по сравнению с мозгом животного.

Бо́льшая ценность означает лишь, что человек прошел более долгий путь эволюции.

Для гемоглобинов не получается корреляция между ценностью и положением в эволюционном древе. По-видимому, это объясняется меньшей древностью гемоглобина, чем цитохрома *c*, и, соответственно, большей долей нейтральных мутаций.

В ходе биологического развития возрастает не только ценность информации, наличествующей в организме, но и способ-

Таблица 17.5. **Разности суммарных ценностей цитохромов *c***

Человек	0,00	Кит	—0,88	Пингвин	0,00
Резус	—0,10	Кенгуру	—0,88	Курица	—0,05
Осел	—0,34	Собака	—1,06	Утка	—0,30
Лошадь	—0,43	Слон	—1,22	Эму	—0,30
Свинья	—0,58	Летучая	—1,25	Голубь	—0,58
Кролик	—0,66	мышь		Черепаха	—0,80

ность биологической системы к отбору ценной информации. Эта способность достигает наиболее высокого уровня у высших животных, органы чувств которых предназначены для такого отбора. Лягушка реагирует лишь на движущееся насекомое, летучая мышь, пользуясь ультразвуковой эхолокацией, воспринимает лишь отраженные, а не прямые сигналы. Отбор ценной информации лежит в основе всей творческой деятельности человека.

Как мы видели (с. 306), для получения одного бита информации нужно затратить энергию, не меньшую $kT \ln 2$. Эта величина есть цена одного бита любой информации — как ценной, так и не представляющей ценности, не являющейся незаменимой. Отбор ценной информации не требует дополнительных энергетических расходов. Для этого достаточно, например, такого устройства каналов в мембране рецепторной клетки, чтобы через них проходили молекулы или ионы определенной формы и размеров. Энергетические расходы, связанные с созданием специализированных каналов или рецепторных участков мембран, были понесены ранее, на предшествующих стадиях биологической эволюции.

Таким образом, живая система способна отбирать ценную информацию, не внося за это особой «платы». Иными словами, живая система развивается, приближаясь к состоянию, в котором она «платит» по $kT \ln 2$ за один бит именно ценной информации и не «платит» ничего за не воспринимаемую информацию, лишенную ценности.

Изложенные здесь представления требуют развития и уточнения. Можно думать, что аминокислотные остатки в разных областях белковой глобулы различаются незаменимостью — ценностью. В области активного центра остатки более незаменимы. Вне активного центра заменимость велика, ценность мала. Соот-

ветственно в этой области происходят беспорядочный дрейф замещений, быстрая эволюция, основанная на нейтральных мутациях или мутациях, слабо уменьшающих адаптацию (нейтралистская теория Кимуры, с. 558). Информационные представления несомненно окажутся полезными при дальнейшем развитии теории эволюции.

Возникновение белка на заре жизни означает создание новой информации. Как это следует из нейтральной теории, структура белка в целом исходно есть запоминание случайного выбора. При последующем «редактировании» происходила подлинная эволюция активной части белка. Надо подчеркнуть, что во многих случаях важная роль в «редактировании» принадлежала ионам металлов, прежде всего цинка, железа, меди и молибдена (ср. § 6.9).

Таким образом, структура любого белка является в некотором смысле реликтовой — она несет память о своем случайном происхождении.

В ходе эволюции многократно создавались новые белки. Как показывают структурные исследования, во многих случаях новый белок содержит структурные элементы — α-спирали, β-ленты и т. д.— своих предшественников. Именно здесь применима гипотеза «конструктор», предложенная Чернавским. Белки и, тем более, геномы строятся из уже выработанных ранее структурных элементов, образующих новые комбинации.

Изложенные здесь представления требуют, конечно, развития и уточнения. В частности, нейтральная теория пока что не рассматривает конкретную природу мутационных замещений, ограничиваясь лишь аминокислотным составом.

Нейтрально заменяемые остатки имеют, очевидно, относительно малую ценность. В дальнейшей эволюции они могут оказаться адаптивными, ценность их повысится. Возникновение новой ценной информации возможно лишь при наличии «пула» информации, обладающей низкой ценностью.

§ 17.9. Сложность и эволюция

Рассмотрев некоторые информационные аспекты биологического развития, обратимся теперь к понятию сложности, тесно связанному с теорией информации. Мы привычно говорим о возрастании сложности биологических систем в ходе эволюции. Как бы ни определять сложность, очевидно, что многоклеточный организм сложнее одноклеточного, что человек сложнее сине-зеленой водоросли. Однако наука требует строгих определений.

Обычно, говоря о сложности, мы имеем в виду число компонентов, образующих систему. Такое определение фигурирует, например, в классическом труде фон Неймана, посвященном теории самовоспроизводящихся автоматов. При этом фон Нейман указывал, что при высокой сложности объекта его описание может быть сложнее, чем он сам. В сложных системах формальной

логики на порядок труднее рассказать, что́ объект может сделать, чем изготовить сам объект. Системы высокой сложности обладают в принципе способностью создавать нечто более сложное, чем они сами.

Строгое определение сложности, позволяющее выразить это понятие количественно, дано в работах Колмогорова, Чаитина, Мартина-Лёфа. Сложный объект может быть закодирован некоторым сообщением, скажем, последовательностью нулей и единиц. Сложность определяется как минимальное число таких двоичных знаков, содержащих всю информацию об объекте, достаточную для его воспроизведения (декодирования). Другими словами, сложность есть выраженная в битах длина самой экономной программы, порождающей последовательность двоичных знаков, описывающую объект.

Рассмотрим некоторые примеры. Допустим, что имеются два сообщения

0101010101010101

0100100011011010

Какое из них сложнее? Конечно, второе. Программа, генерирующая первое сообщение, гласит $(01)^8$ или «напиши 01 восемь раз». Второе сообщение такой сокращенной программы не имеет, программа гласит «напиши 0100100011011010». Программа имеет ту же длину, что и само сообщение.

Другой пример. Сообщается число 3,1416 и т. д. Экономная программа есть просто буква π, выражающая отношение длины окружности к ее диаметру.

Примечательно, что определяемая таким образом сложность эквивалентна случайности — случайная последовательность элементов, скажем, двоичных единиц, характеризуется сложностью, приближенно совпадающей с выраженной в битах длиной этой последовательности. Любая минимальная программа необходимым образом случайна, лишена регулярности. Рассмотрим программу П, минимальную для генерации ряда двоичных единиц, сообщения С. Если предположить, что П не случайна, то по определению должна существовать более короткая программа П′, генерирующая П. Можно произвести С посредством следующего алгоритма: «Вычисли П из П′, затем вычисли С из П». Иными словами, в этом случае программа П не минимальна.

Однако представление о минимальной программе, вводимое при рассмотрении понятий сложности и случайности, встречается с принципиальными трудностями. Легко показать, что некоторая последовательность двоичных единиц не случайна — для этого достаточно найти программу, генерирующую эту последовательность, меньшую, чем сама последовательность. Но можно ли утверждать, что эта программа действительно минимальна? И можно ли, с другой стороны, доказать, что данная последовательность

случайна, сложна, т. е. что не существует более короткой программы для ее воспроизведения?

Такие утверждения невозможны вследствие теоремы Гёделя о неполноте. Современная математика рассматривает так называемые системы. Гильберт ввел в качестве такой системы язык, состоящий из конечного алфавита символов, определенной грамматики, с помощью которой формируются осмысленные утверждения, конечного числа аксиом и конечного числа правил для вывода теорем из аксиом и других теорем. В 1931 г. Гёдель показал, что любая формальная система такого рода не может включать все истинные теоремы и поэтому не полна. Доказательство Гёделя связано с парадоксом критянина Эпименида: «Все критяне лжецы». Или, в иной формулировке: «Это утверждение ложно» — утверждение истинное, только если оно ложно. Гёдель заменил понятие истинности понятием доказуемости: «Это утверждение не доказуемо». Таким образом, либо ложность доказуема, что запрещено, либо истинное утверждение не доказуемо и, следовательно, формальная система не полна. В формальной системе нельзя доказать, что определенная последовательность двоичных единиц имеет сложность, более высокую, чем число бит в программе, используемой для нахождения этой последовательности. Следовательно, нахождение минимальной программы всегда до некоторой степени условно и понятие сложности имеет относительный характер.

В связи со сказанным отметим, что задача науки состоит в нахождении минимальной программы, генерирующей (объясняющей) исследуемую сложность совокупности фактов. В этом состоит смысл «бритвы Оккама» в науке — «сущности не следует умножать без необходимости». Так, закон тяготения Ньютона программирует и падение яблока, и движения планет. Но теорема Гёделя не позволяет доказать минимальность, т. е. максимальную экономичность, программы логически. Именно поэтому логические рассуждения недостаточны для развития науки. Научное познание требует интуиции. Как говорил Мандельштам, уравнение Шредингера не выведено, а угадано.

Вернемся к биологии. Сложность, определение которой мы приняли, действительно, как правило, возрастает в эволюции, в филогенезе, но имеются и обратные ситуации. Так, например, эволюционный переход к паразитическому образу жизни означает не усложнение, но упрощение.

Наиболее сложными объектами в природе являются индивидуальные живые организмы, а среди них — человек. Каждая личность уникальна и не может быть закодирована сокращенной программой. В этом смысле «заменимых нет». Очевидно, что сказанное относится и к творческим созданиям человека, например, к произведениям литературы и искусства. Нельзя дать минимальную программу «Войны и мира» — невозможен алгоритм для упрощения истинно художественного произведения без утраты его сущности.

Однако каждый организм — не только индивидуальная особь. Л. Н. Толстой не только великий писатель — он *Homo sapiens*. Иными словами, он представитель царства животных, типа хордовых, подтипа позвоночных, класса млекопитающих, отряда приматов, надсемейства человекоподобных приматов, семейства людей (*Hominidae*), рода *Homo*, вида *Homo sapiens*. В пределах каждого подразделения все его представители эквивалентны, описываются одной и той же минимальной программой. Здесь «незаменимых нет», и как представитель вида *Homo sapiens* любой человек, независимо от цвета кожи и иных наследственных признаков, эквивалентен любому другому.

Очевидно, что минимальная программа удлиняется, сложность возрастает в иерархической системе живой природы от царства к виду и далее, к индивидууму. Раскрытие этой реально существующей в природе иерархии, начатое Линнеем,— одно из величайших событий в истории науки. Как показывает современное эволюционное учение, само возникновение этой иерархии, завершающейся видообразованием, определяется естественным отбором и законами генетики.

Мы видим, что понятие сложности относительно — оно зависит от уровня рассмотрения, уровня рецепции. На уровне царства данный представитель *Homo sapiens* эквивалентен скорпиону, на уровне типа — ланцетнику, на уровне класса — двуутробке, на уровне отряда — лемуру, на уровне надсемейства — шимпанзе, на уровне семейства — австралопитеку, на уровне рода — человеку прямоходящему (*Homo erectus*). Сложность возрастает с ростом сходства рассматриваемых животных.

Для биолога мозг быка есть сложнейшая система, требующая сотен и тысяч бит для своего описания, но для мясника описание этого же мозга требует не более пяти бит, так как мозг — всего лишь одна из примерно тридцати различных частей тела быка, идущих в пищу.

Мы видим, что понятие сложности сходно с понятием ценности информации, рассмотренным в предыдущем параграфе. Мы определили ценность информации как незаменимость, неизбыточность на данном уровне рассмотрения, уровне рецепции. Очевидно, что приведенное здесь определение сложности сходно с указанным определением ценности — то, что нельзя заменить более короткой программой, незаменимо, неизбыточно. Имеются, однако, и различия двух обсуждаемых понятий.

Во-первых, понятие сложности относится к объекту, к последовательности двоичных единиц в целом. Напротив, можно говорить о ценности — незаменимости, неизбыточности — отдельного элемента такой последовательности. Выше были даны условные определения ценностей кодонов и аминокислотных остатков.

Во-вторых, понятие сложности характеризует только структуру объекта. Напротив, ценность, т. е. незаменимость, одновременно отражает функциональность и объекта, и его отдельных элементов.

Таким образом, понятие ценности информации, введенное в предыдущем разделе, шире понятия сложности и, в сущности, включает сложность. Пользуясь понятием ценности, можно преодолеть трудность, связанную с тем, что в эволюции может происходить не усложнение, но упрощение. Такие факты противоречат возрастанию сложности при биологическом развитии. Спрашивается, что происходит в этих ситуациях с ценностью информации?

Рассмотрим как пример эволюционное упрощение червя *Bonellia viridis*. Самка этого животного имеет макроскопические размеры, это сложный многоклеточный организм, обладающий многообразными функциями. Самец, напротив, микроскопичен, живет в половых протоках самки и способен лишь к оплодотворению. Очевидно, что минимальная программа и сложность самца резко уменьшены по сравнению с самкой. Но что это значит?

Надо думать, геном самца не слишком сильно отличается от генома самки. Однако у самца значительная часть генов заблокирована, не функционирует. Укороченная программа характеризует не укорочение генома, но укорочение его функциональности вследствие указанной блокировки.

Уменьшение программы может происходить по двум причинам. Во-первых, может уменьшиться объем функционирующей информации, т. е. может укоротиться действующий, не блокированный геном. Во-вторых, текст этого функционального сообщения может измениться, став более упорядоченным, т. е. функционирующая информация может стать частично избыточной. В этом случае происходит упрощение текста, он становится менее случайным. В первом случае ценность каждого элемента сообщения, каждой буквы остается высокой и может даже возрасти, во втором случае убывает и сложность, и ценность. Есть основания думать, что при эволюционном упрощении, определяемом специфической адаптацией паразита или самца червя *Bonellia*, реализуется первый случай — сложность убывает, а удельная ценность функциональной генетической информации не убывает и может даже возрастать. Высокая ценность означает высокую приспособленность (и приспособляемость), незаменимость и структуры, и функций.

Мы приходим к выводу, что в качестве одного из основных принципов теоретической биологии можно ввести не принцип возрастания сложности, но принцип возрастания ценности, т. е. незаменимости информации как в филогенетическом, так и в онтогенетическом биологическом развитии. Этот принцип не является независимым от естественного отбора и конвариантной редупликации (т. е. от генотипической памяти). Однако именно формулировка этого принципа подчеркивает необратимость, т. е. направленность биологической эволюции.

Дальнейшие исследования, которые должны объединить эволюционную биологию с биофизикой, требуют детального изучения геномов. Мы ведь не знаем пока, какая часть генома ответ-

ственна за видовые и какая — за индивидуальные признаки. Исходя из молекулярно-генетических данных, количество которых пока чрезвычайно мало, опираясь на уже развитые информационные подходы, будущая наука построит модельную физико-математическую теорию эволюции. Эта теория ответит в количественной форме на ряд вопросов, относящихся к материалам и к темпам эволюции. Мы находимся в начале построения теоретической биологии, фундамент которой был заложен Дарвином и Менделем.

§ 17.10. Онтогенез

В отличие от филогенеза, направленность индивидуального развития — онтогенеза — очевидна непосредственно. Онтогенез включает три основных процесса — *дифференцировку* клеток, *рост*, т. е. увеличение числа клеток и массы зародыша, и *морфогенез*, т. е. возникновение определенных органов и организма в целом. Все эти процессы развиваются в соответствии с генетической программой.

В основе клеточной дифференцировки лежит дифференцировка молекулярная. Во всех соматических клетках многоклеточного организма содержится один и тот же набор генов, тождественный геному исходной зиготы. Это положение доказано прямыми опытами. Гердон установил, что если пересадить ядро клетки эпителия кишечника головастика в икринку лягушки, ядро которой предварительно разрушено ультрафиолетовым облучением, то из такой икринки развивается нормальная особь. В специализированной клетке большинство генов репрессировано, в ней могут синтезироваться лишь определенные белки. При переносе специализированного генома в зиготу гены оказываются освобожденными от репрессии и происходит нормальное развитие. Химические исследования клеточной дифференциации уже привели к важным результатам. Уэсселс и Раттер выращивали культуру эмбриональной ткани — клетки поджелудочной железы крысы. Этот орган производит ферменты, участвующие в переваривании пищи, и гормоны, регулирующие метаболизм углеводов. Так называемые экзокринные клетки секретируют зимогены — предшественники пищеварительных ферментов, эндокринные клетки выделяют гормоны — глюкагон и инсулин. Исследовалась продукция всех этих белков на разных стадиях эмбрионального развития, и была установлена корреляция содержания белка с появлением определенных внутриклеточных структур. Продукция специализированных белков возрастает во времени не монотонно, но проходит через три регуляторных фазы (рис. 17.12). Установлено, что мезодермальные клетки из других органов промотируют дифференцировку клеток поджелудочной железы. Это, по-видимому, объясняется действием некоего фактора, возможно белковой природы.

Синтез секреторных белков в культуре эпителиальных клеток поджелудочной железы специфично подавляется актиномицином-D — антибиотиком, блокирующим синтез РНК. Последовательное подавление синтеза различных белков актиномицином

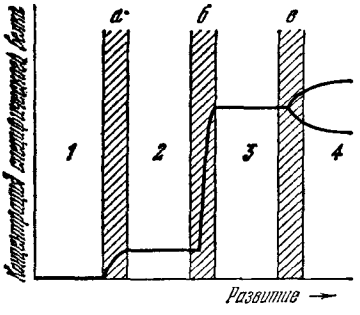


Рис. 17.12. Изменение продукции специализированных белков в ходе эмбриогенеза: *1* — предифференцированное состояние; *2* — протодифференцированное состояние (стадия I); *3* — дифференцированное состояние (стадия II); *4* — дефинитивное состояние (стадия III); *а*, *б*, *в* — переходы

показывает, что соответствующие мРНК синтезируются в разное время (ср. с. 289).

По-видимому, фазы развития определяются кооперативным действием множества генов. Происходит одновременная активация одних групп генов и инактивация других, но не последовательная активация каждого из сотен отдельных генов. Возможно, что согласованные кооперативные переходы, имеющие характер фазовых переходов (см. далее), определяются изменениями хромосомной структуры.

В онтогенезе представлены два типа процессов. Первый тип — регуляторные внутри- и межклеточные взаимодействия, обусловленные явлениями молекулярной сигнализации, молекулярного узнавания. Эти явления и определяют прежде всего дифференцировку. Второй тип — активные перемещения клеток в результате механохимических процессов, также стимулированных молекулярной сигнализацией. Эти перемещения определяют *морфогенез*.

Само деление клеток, начиная с появления двух первых бластомеров, есть результат внутриклеточных взаимодействий, регуляции активности генов веществами цитоплазмы и клеточной мембраны. Дифференцировка на ранней стадии (*бластула*) определяется двумя причинами, имеющими самый общий характер. Первая из них — неоднородное распределение вещества в цитоплазме исходной зиготы, вторая — неоднородность среды внутри клеточного шара, получающегося в результате дробления. И то, и другое означает наличие *позиционной информации* (Вольперт). Наряду с этими факторами онтогенез определяется контактной и гуморальной регуляцией.

На поздних стадиях развития включается действие гормонов. Сложный способ развития — метаморфоз у насекомых — находится под контролем *экдизона* — гормона роста.

Одним из важнейших веществ онтогенеза является цАМФ (см. с. 42), служащая для молекулярной внутри- и межклеточ-

ной сигнализации. Показано, что цАМФ может индуцировать дифференцировку и морфогенез в недифференцированных клетках *in vitro*.

Роль цАМФ в развитии ярко демонстрируется в биологии *миксомицетов*. Если пищи имеется вдоволь, то эти организмы существуют как амебоподобные одноклеточные. При нехватке пищи миксамебы агрегируют в псевдоплазмодий, который развивается как многоклеточный организм, содержащий десятки тысяч клеток, вплоть до превращения в спорофоры и спорового размножения. Агрегация и дифференцировка миксомицетов происходят в результате выделения цАМФ и рецепции этих молекулярных сигналов.

Онтогенез подобен филогенезу — эволюционному развитию — в том смысле, что развивающийся зародыш представляет собой своего рода биоценоз, в котором сосуществуют популяции специализированных клеток. Сам «зародышевый биоценоз» формируется этими популяциями. «Зародышевый биоценоз» не статическая, но динамическая система с предопределенным поведением. Делящиеся клетки не подвержены случайной изменчивости. Развитие биоценоза определяется внешними воздействиями и внутри- и межклеточными взаимодействиями, но оно запрограммировано генотипом. В § 17.9 рассмотрены информационные аспекты онтогенеза. Задачи теоретического моделирования онтогенеза еще далеки от своего решения. Однако ряд работ в этой области заслуживает внимания, обещая ее дальнейшее развитие.

Естественно, что первые попытки модельного описания онтогенеза имели чисто биологический характер. Гурвич предложил формальный метод трактовки межклеточных взаимодействий в морфогенезе, связав с каждой клеткой некоторое «*биологическое поле*», выходящее за пределы клетки и влияющее на ее соседей. Поля нескольких клеток векторно суммируются и вызывают перемещение клеток, необходимое для формообразования (1944). Уоддингтон ввел понятие *эпигенетического ландшафта*. Развитие организма уподобляется движению по пересеченной местности в фазовом пространстве. Маршрут движения определяется характером местности и внешними воздействиями. В онтогенезе происходит канализация развития — морфогенетические потенции клеточных популяций постепенно ограничиваются. Уоддингтон называет *креодом* канализованную траекторию развития, притягивающую к себе ближайшие (1968).

В развивающемся зародыше происходят регуляторные процессы, приводящие к его самоорганизации — к самопроизвольному формированию макроскопической структуры. Как мы видели, эти явления возможны в диссипативных системах, далеких от равновесия. Для рассмотрения онтогенеза вводится понятие *морфогенетического поля* (*МГП*). МГП некоторого зачатка формируется группой согласованно развивающихся клеток. Уже имеющийся зачаток подавляет формирование другого, ему идентичного. Если поле разделено на части, каждая из них может вос-

становить полное поле так, что сформируются два зачатка. Слияние двух МГП приводит к их реорганизации в одно МГП. Идея МГП была выдвинута Гурвичем. Что можно сказать о физике этих явлений?

В теории МГП сыграла роль модель Тьюринга, описанная в § 15.4. Автокаталитическая диссипативная система, в которой возможна диффузия неких веществ — морфогенов, оказывается способной к пространственной и временной самоорганизации. Ряд работ Мейнхардта, Кауфмана и др. был посвящен развитию теории Тьюринга. Однако диффундирующие морфогены не обнаруживаются в эксперименте.

В последнее время было показано, что основными для онтогенеза являются процессы, определяемые механохимической активностью клеток, и другие деформации зародышевого материала. Клетки активно прикрепляются к упругой или жесткой подложке. В этих процессах происходит перестройка цитоскелета (§ 12.6) и общая деформация клетки. Шаровидная клетка уплощается. При этом упругий субстрат вокруг клетки испытывает натяжения. Соответствующая механическая работа обеспечивается метаболизмом. В коллективах клеток формируются и стабилизуются диссипативные структуры. Так, в одном из опытов культура фибробластов гомогенно диспергировалась в коллагеновом теле, границы которого закреплялись. При повышении концентрации клеток происходил спонтанный переход в макроскопически организованное состояние — возникали периодические сгущения клеток. Исходное состояние гомогената оказывалось неустойчивым по отношению к флуктуациям. Ситуация, сходная с моделью Тьюринга. Однако роль фактора дальнодействующей сигнализации, обеспечивающей возникновение упорядоченности, здесь играли не морфогены, а деформация упругого субстрата.

Рассмотрим модель морфогенеза на основе зародышевых эпителиев. Деформации эпителиальных пластов: складки, вытягивания, изгибы и т. д.— служат формообразующими механизмами. Процесс состоит из ряда стадий. Прежде всего осуществляется «разметка»— в эпителии выделяется некая активная область. В этой области пласт клеток утолщен — клетки удлинены, поляризованы в нормальном к пласту направлении. Образование поляризованных клеточных доменов служит началом морфогенеза животных.

Теоретическая модель (Белинцев) исходит из следующих положений:

1. Клетки пласта способны самопроизвольно деформироваться, обладая двумя дискретными устойчивыми формами — изотропной и поляризованной.

2. Клеточный материал эпителиальной ткани рассматривается как сплошная среда, обладающая пассивной упругостью.

3. Механохимическая активность данной клетки подвержена контактному влиянию соседних. Этим обеспечивается кооперативность поляризации клеток.

Для расчета вводим параметр поляризации клеток p. В изотропном состоянии $p = 0$, в поляризованном $p > 0$. Состояние пласта в целом характеризуем непрерывным скалярным полем $p(r, t)$, где r — радиус-вектор, лежащий в плоскости пласта, t — время. Уравнение динамики поля имеет вид

$$\frac{\partial p}{\partial t} = \frac{1}{\tau} f(p) + D_p \nabla^2 p - \varkappa \operatorname{Sp} \sigma_{ik}. \tag{17.31}$$

Здесь τ — характерное время активной деформации клетки порядка 10 мин, D_p — кинетический коэффициент контактного переноса поляризации. Второй член справа имеет диффузионный характер; σ_{ik} — тензор касательных упругих напряжений, Sp — след тензора, $\varkappa$ — коэффициент. Функция $f(p)$ нелинейна — возможность перехода из изотропного состояния в поляризованное (механохимия!) связана с И-образной формой $f(p)$. Последний член справа учитывает то обстоятельство, что всестороннее растяжение должно препятствовать поляризации клетки, а сжатие — ей способствовать.

В отсутствие внешних сил источником упругих напряжений в пласте являются касательные сдвиги, возникающие вследствие поляризации клеток. В первом приближении активное деформирующее напряжение можно считать изотропным в плоскости пласта и пропорциональным p:

$$\sigma_{ik} = \varepsilon \delta_{ik} p. \tag{17.32}$$

Реакция на это напряжение — вектор касательных смещений $\mathbf{u}$ находится из условия равновесия, релаксация к которому мгновенна в масштабе времени клеточной популяции, как это показывает опыт. Условие равновесия выражается уравнением

$$-q\mathbf{u} + \frac{Eh}{1-\sigma^2} \operatorname{grad} \operatorname{div} \mathbf{u} + \varepsilon \operatorname{grad} p = 0, \tag{17.33}$$

где E и σ — модуль Юнга и коэффициент Пуассона клеточного пласта, q — модуль сдвига подложки, h — толщина пласта. Из (17.33) получаем

$$\operatorname{Sp} \sigma_{ik} = \frac{E}{1-\sigma} \operatorname{div} \mathbf{u} = \frac{\varepsilon \varkappa E}{q(1-\sigma)} \int K_0 \left(\frac{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|}{R_d} \right) \Delta p(r', t)\, d^2 r', \tag{17.34}$$

где $K_0(\rho)$ — цилиндрическая функция мнимого аргумента, имеющая логарифмическую особенность при $\rho \to 0$ и убывающая как $e^{-\rho}/\sqrt{\rho}$ при больших ρ;

$$R_d = \left[\frac{hE}{(1-\sigma^2)\, q} \right]^{1/2}.$$

После подстановки (17.34) в (17.31) имеем замкнутое описание эволюции поля $p(r, t)$.

В отличие от модели Тьюринга, в основу этой модели положены постулаты, вытекающие из опыта. Конечно, дальнейшее развитие теории требует исследований на молекулярном и надмолекулярном уровнях. Эти задачи еще не решались.

Анализ механохимической поляризационной модели показывает, что система характеризуется сложным параметром

$$\mu = f'(0) + \frac{\varkappa \varepsilon}{\tau} - 2 \frac{R_p}{R_d}, \tag{17.35}$$

где $R_p = \sqrt{D_p \tau}$. При значениях $\mu < 0$ поляризация клеток в пласте не может возникнуть самопроизвольно. При $\mu \geqslant 0$ происходит спонтанное включение механохимической активности, вызываемое неустойчивостью макросостояния $p = 0$ к флуктуационным возмущениям $\delta p(r, t)$. Возникает пространственно-модулированное распределение морфологической поляризации. Степень его упорядоченности зависит от отношения двух характерных длин: диапазона когерентности процесса контактной поляризации R_p и радиуса R_d распространения упругой реакции на локальную поляризацию клеток.

При $R_p \leqslant R_d$ пространственно-модулированное стационарное распределение $p(r)$ представляет собой регулярную ячеистую структуру. В случае $R_d \gg R_p$ реализуется нерегуляриая пятнистая структура с размером пятен ие меньше некоторого минимального промежутка между ними $l \geqslant R_d$.

Результаты анализа модели подтверждаются, в частности, данными о морфогенезе различных структур кожного покрова. Разметка этих структур определяется расположением зон морфологической поляризации клеток в эпидермисе зародыша. Наблюдаются гексагональные решетки (в случае перьев) или нерегулярные распределения с ограниченными снизу промежутками (волосы, щетинки и т. п.).

Если размеры пласта $L < R_d$ и $R_p \ll L$, то исследование модели дает следующее.

Вычленение в изначально однородной группе неполяризованных клеток домена с выраженной поляризацией может возникать либо спонтанно (вследствие описанной неустойчивости), либо, при $\mu < 0$, при воздействии локализованного внешнего стимула.

Эффект подавления обеспечивается тангенциальными натяжениями пласта.

Таким образом, эмбриональная регуляция действительно может объясняться коллективной механохимической активностью клеток.

Физико-математическое моделирование онтогенеза находится в начальной стадии. Очевидно, что исследование онтогенеза относится к наиболее интересным и важным разделам биофизики.

§ 17.11. Иммунитет

Специфические процессы клеточной дифференцировки ответственны за иммунитет, в частности, за продукцию антител в организмах позвоночных.

Строение и функции антител (АТ), их взаимодействие с антигенами (АГ) описаны в § 4.8. Рассмотрим возникновение иммунитета.

Иммунная система служит для борьбы с болезнетворными микроорганизмами. Этим, однако, дело не ограничивается — иммунитет обеспечивает контроль за генетическим постоянством клеток организма. Главной задачей иммунной системы является устранение мутантных (в частности, раковых) клеток из организма животного. В ответ на появление антигена организм вырабатывает специфические реактивные клетки (клеточный иммунный ответ) и специфические антитела (гуморальный иммунный ответ). И реактивные клетки, и АТ циркулируют в организме и специфически взаимодействуют с АГ. В результате чужеродный материал может быть инактивирован, разрушен или фагоцитирован клетками ретикуло-эндотелиальной системы. Современные представления об иммунитете основываются на *клонально-селекционной теории* Бернета (1949). В организме производятся лимфоциты, каждый из которых чувствителен к одному АГ или к нескольким родственным АГ. Возникают лимфоциты, чувствительные практически к любым АГ, в том числе и к таким, с которыми организм никогда не встречался в биологических условиях. Это определяется наличием на мембранах лимфоцитов специ-

фических рецепторов, имеющих высокое сродство к определенному АГ. Антиген действует как фактор селекции, стимулирующий развитие клонов иммунологически активных клеток из лимфоцитов, имеющих рецепторы к данному антигену.

Антитела продуцируются зрелыми плазматическими клетками (z-клетками). Специфичность АТ совпадает со специфичностью рецепторов, находящихся на поверхности клеток-предшественников. Таковыми являются так называемые В-клетки, относящиеся к малым лимфоцитам и образующиеся в результате дифференцировки стволовых кроветворных клеток. Роль рецепторов в В-клетках играют иммуноглобулины ($10^4 - 10^5$ молекул на клетку). В-клетки обретают способность к делению, к пролиферации после трансформации в так называемые *бласты* (у-клетки) под действием АГ. Бласт-трансформация происходит по истечении латентного периода, длящегося 24—48 часов. Y-клетки интенсивно пролиферируют. Часть у-клеток дает начало клонам плазматических z-клеток. Данный клон z-клеток вырабатывает антитела. Зрелые z-клетки не делятся, они существуют несколько десятков часов.

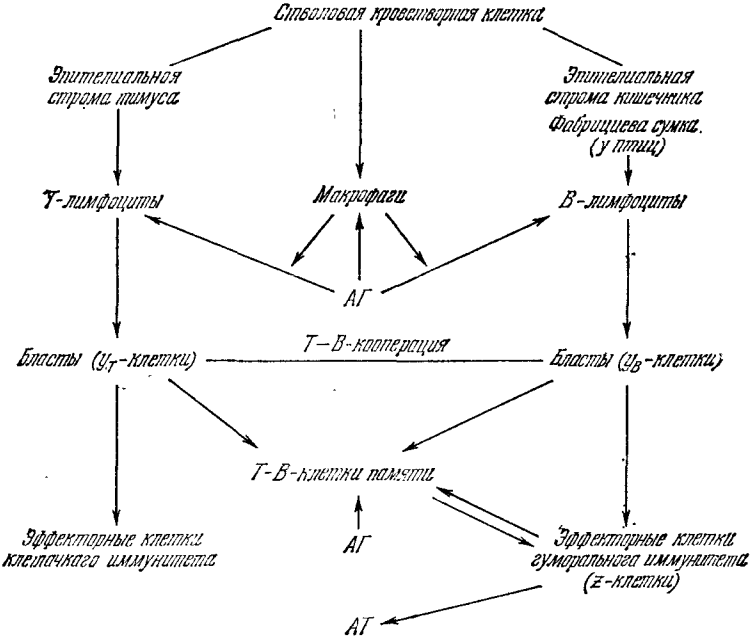


Рис. 17.13. Схема событий, вызываемых введением антигена

Стимулированные антигеном В-лимфоциты могут, наряду с образованием клона z-клеток, привести к образованию клеток иммунной памяти. Вторичный иммунный ответ организма на АГ, воздействию которого он подвергался ранее, обычно оказывается более быстрым и сильным, чем первичный ответ. Это явление на-

вывается *иммунной памятью*, оно связано с увеличением числа клеток, способных отвечать на повторный АГ-стимул аналогично первоначальным В-лимфоцитам.

Второй популяцией лимфоцитов, способных к специфическому распознаванию генетически чужеродного материала, являются так называемые Т-клетки. Как и В-клетки, они возникают из стволовых клеток, но в своем развитии обязательно проходят через тимус. Часть Т-клеток ответственна за клеточные иммунные реакции. В ответ на АГ-стимул они дифференцируются в специфические реактивные клетки — киллеры. Две другие субпопуляции Т-клеток — хелперы и супрессоры — играют регуляторную роль в развитии гуморального иммунитета. Существуют, однако, и тимус-независимые АТ, способные вызывать нормальный ответ без помощи Т-клеток.

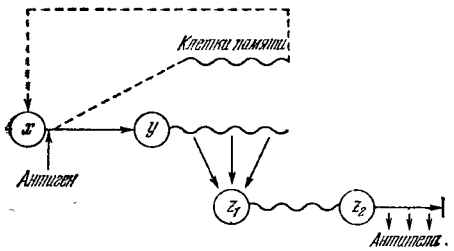


Рис. 17.14. Схема развития АТ-продуцирующих клеток. Волнистые линии означают пролиферацию

На рис. 17.13 показана схема описанных событий.

В явлениях иммунитета мы встречаемся с рядом фундаментальных проблем биологии и биофизики. Это — проблемы клеточной дифференцировки молекулярного и клеточного узнавания. Явления иммунитета сравнительно хорошо изучены.

Остановимся на модельной теории гуморального иммунитета, развитой в работах Диброва, Лившица и Волькенштейна (1976—1978). В этой теории непосредственно учитывается запаздывание иммунного ответа, т. е. выработки АТ, по отношению к моменту стимуляции. Развитие z-клеток из В-лимфоцитов требует 3—4 дней. Для формирования клеток памяти нужно еще большее время. Схема развития клона АТ-продуцирующих клеток показана на рис. 17.14.

Математический анализ показывает, что продолжительность запаздывания может быть решающей для характера иммунной реакции.

Скорость выработки антител пропорциональна наличному количеству плазматических клеток, которое определяется числом В-лимфоцитов, АГ-стимулированных ранее, в момент времени, отстоящий от текущего на время запаздывания t_r. Аналогично, выработка клеток памяти определяется числом актов стимуляции В-лимфоцитов в момент, отстоящий от текущего на время запаздывания t_m.

Процесс описывается системой дифференциальных уравнений с запаздывающим аргументом:

$$\begin{aligned} \dot{x} &= J - \tau^{-1}x(t) - Px(t)g(t) + A_m x(t-t_m)g(t-t_m)\theta(t-t_m), \\ \dot{g} &= Kg(t) - Qh(t)g(t), \\ \dot{h} &= A_r x(t-t_r)g(t-t_r)\theta(t-t_r) - Rh(t)g(t) - Sh(t). \end{aligned} \tag{17.36}$$

Здесь x, g, h — соответственно количества В-лимфоцитов, антигена (скажем, размножающихся микроорганизмов) и антител;

$$\theta(t) = \begin{cases} 0, & \text{если } t < 0, \\ 1, & \text{если } t \geqslant 0. \end{cases}$$

J — скорость пополнения популяции В-лимфоцитов в результате дифференцировки стволовых клеток, τ — среднее время жизни В-лимфоцитов. Второй и третий члены правой части уравнения для $\dot{x}$ описывают соответственно уменьшение числа В-клеток в результате контакта с АГ и его увеличение вследствие формирования клеток памяти, которые считаются идентичными первоначальным В-лимфоцитам. K — константа скорости репродукции АГ в организме, члены с Q и R описывают соответственно уменьшение количеств АГ и АТ в результате их взаимодействия. Член с A_r описывает производство АТ, S характеризует скорость распада АТ. Параметры P, A_m, A_r, t_m, t_r могут зависеть от динамики численности регулярных Т-клеток. Для тимусзависимых АТ от этого можно отвлечься, равно как и при быстром достижении стационарного числа Т-клеток. Считаем эти параметры постоянными.

Для детального изучения иммунных реакций целесообразно упростить систему (17.36). АТ имеют высокое сродство к АГ. Поэтому до тех пор, пока количество АГ не слишком мало, появляющиеся АТ быстро реагируют с АГ. Действительно, заметные количества АТ наблюдаются лишь после удаления АГ. Это позволяет аппроксимировать систему (17.36) уравнениями

$$\begin{aligned} \dot{x} &= J - \tau^{-1}x(t) - Px(t)g(t) + A_m(t-t_m)g(t-t_m)\theta(t-t_m), \\ \dot{g} &= Kg(t) - A_r\frac{Q}{R}x(t-t_r)g(t-t_r)\theta(t-t_r). \end{aligned} \tag{17.37}$$

Эти уравнения сходны с уравнениями Вольтерра для системы «хищник — жертва» (см. § 15.3), если $A_m > P$. Отличие состоит в учете запаздывания в нелинейных членах.

Исследование уравнений (17.37) показывает, что характер стационарных точек на фазовых портретах существенно зависит от запаздывания. Для эффективного подавления быстро размножающегося АГ время t_m должно быть не слишком малым и не слишком большим. Можно было бы ожидать, что увеличение t_m должно всегда приводить к увеличению времени, требуемого для элиминации АГ. В действительности, однако, нарастание неустойчивости с ростом запаздывания может привести к сокращению времени реакции благодаря уменьшению числа обходов стационарной точки.

Учтем теперь конечную скорость реакции АТ и АГ, считая, что количество В-лимфоцитов мало меняется в ходе иммунной реакции, т. е. $x(t) \approx x(0)$. Уравнения (17.36) принимают форму

$$\begin{aligned} \dot{g} &= Kg(t) - Qh(t)g(t), \\ \dot{h} &= Ag(t-t_r)\theta(t-t_r) - Rg(t)h(t) - Sh(t), \end{aligned} \tag{17.38}$$

где $A = A_r x(0)$. Если $KR/AQ < 1$, система имеет две стационарные точки (0, 0) и $h_0 = K/Q$, $g_0 = (S/R)(KR/AQ)/(1 - KR/AQ)$. Точка (0, 0) неустойчива, характер второй точки зависит от параметров и, в частности, от запаздывания t_r. На рис. 17.15 показаны фазовые траектории системы (17.38) в безразмерных переменных g/g_0, h/h_0 для $KR/AQ = 0{,}5$; $S/R = 3$ и различных значений запаздывания t_rK. Стационарная точка на рис. 17.15, *а* — устойчивый фокус — соответствует такому течению болезни, когда, начиная с некоторого момента, болезнь не прогрессирует, а количество АГ в организме практически постоянно — организм становится носителем инфекции. Малое значение g_0 соответствует выздоровлению. На рис. 17.15, *б—г* фигурируют предельные циклы, что соответствует периодическому течению болезни. С увеличением запаздывания амплитуда колебаний увеличивается, а минимальное количество АГ уменьшается. При этом доля времени, в течение которого количество АГ близко к нулю, растет. Случай рис. 17.15, *д* отвечает неустойчивости и неограниченному возрастанию АГ, т. е. гибели организма.

При учете конечной скорости реакции АГ с АТ в рамках детерминистических уравнений (17.36)—(17.38) полная элиминация размножающихся АГ невозможна. Но при малых концентрациях АГ нужно рассматривать дискретный стохастический процесс (§ 15.6) и АГ могут быть уничтожены полностью.

Теория дает возможность обосновать тактику лечения инфекционного заболевания. Иммунную сыворотку, т. е. специфические АТ целесообразно вводить в момент максимального количества собственных АТ. Наибольший эффект от применения антибиотиков возможен, если начинать их введение в тот момент,

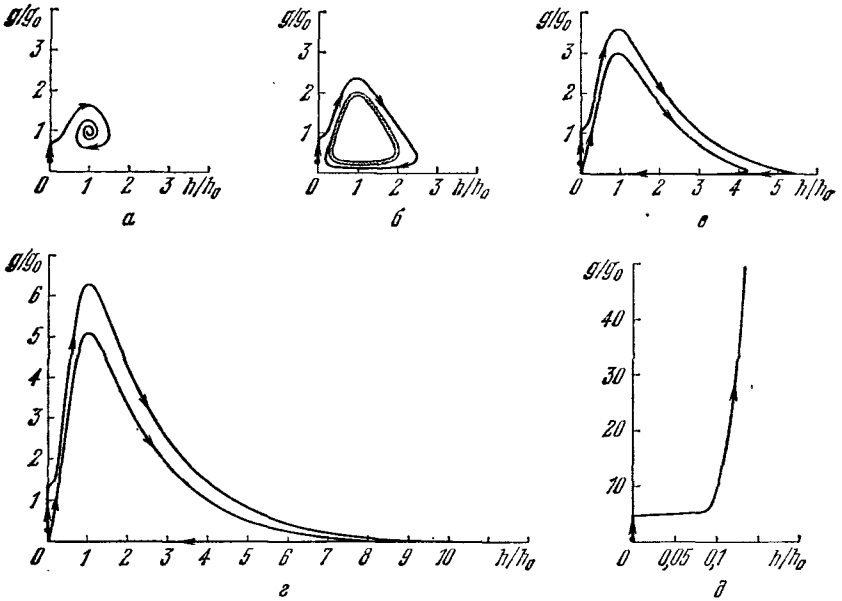


Рис. 17.15. Фазовые траектории системы (17.38) при значениях запаздывания t_rK, равных 1 (*а*), 1,25 (*б*), 1,75 (*в*), 2 (*г*) и 3 (*д*)

когда количество АГ максимально. Слишком раннее применение как антибиотиков, так и антител ослабляет собственный иммунный ответ организма, что увеличивает вероятность рецидива. В случае слабых хронических инфекций одним из приемов лечения может быть преднамеренный перевод заболевания в острую форму, что позволяет активировать иммунный ответ организма, и тем самым увеличить вероятность полного элиминирования АГ. Иная модель тех же явлений, также приводящая к практическим выводам, детально разработана Марчуком и его сотрудниками.

Проблемы возникновения иммунитета — проблемы развития. Можно думать, что принципы трактовки иммунитета, такие, как учет запаздывания, а также рассмотрение фазовых переходов в неравновесных мультистационарных системах помогут моделированию онтогенеза, канцерогенеза, биологической эволюции.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

К главе 1

Волькенштейн М. В. Молекулярная биофизика.— М.: Наука, 1975.— Гл. 1.
Волькенштейн М. В. Физика и биология.— М.: Наука, 1980.
Шредингер Э. Что такое жизнь с точки зрения физики.— М.: Атомиздат, 1972.
Вилли К., Детье В. Биология.— М.: Мир, 1974.

К главе 2

Волькенштейн М. В. Молекулярная биофизика.— М.: Наука, 1975.— Гл. 2.
Ленинджер А. Биохимия.— М.: Мир, 1974.
Вилли К., Детье В. Биология.— М.: Мир, 1974.
Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации.— М.: Мир, 1977.

К главе 3

Волькенштейн М. В. Молекулярная биофизика.— М.: Наука, 1975.— Гл. 3.
Волькенштейн М. В. Конфигурационная статистика полимерных цепей.— М.— Л.: Изд. АН СССР, 1959.
Бирштейн Т. М., Птицын О. Б. Конформации макромолекул.— М.: Наука, 1964.
Флори П. Статистическая механика цепных молекул.— М.: Мир, 1971.
Хохлов А. Р. Статистическая физика макромолекул.— М.: Изд. МГУ, 1985.
Гросберг А. Ю., Хохлов А. Р. Физика цепных молекул.— М.: Знание, 1984.
Дашевский В. Г. Конформационный анализ макромолекул.— М.: Наука, 1987.
Тенфорд Ч. Физическая химия полимеров.— М.: Химия, 1965.

К главе 4

Волькенштейн М. В. Молекулярная биофизнка.— М.: Наука, 1975.— Гл. 1.
Волькенштейн М. В. Общая биофизика.— М.: Наука, 1978.— Гл. 1.
Бирштейн Т. М., Птицын О. Б. Конформации макромолекул.— М.: Наука, 1964.
Флори П. Статистическая механика цепных молекул.— М.: Мир, 1971.
Пиментел Д., Мак-Клеллан О. Водородная связь.— М.: Мир, 1964.
Сб.: Структура и стабильность биологических макромолекул.— М.: Мир, 1973.
Александров В. Я. Клетки, макромолекулы и температура.— Л.: Наука, 1975.

К главе 5

Волькенштейн М. В. Молекулярная биофизика.— М.: Наука, 1975.— Гл. 5 и 7.
Современная кристаллография.— М.: Наука, 1979.— Т. 1, 2.
Бландер Т., Джонстон Л. Кристаллография белка.— М.: Мир, 1979.
Сб.: Структура и стабильность биологических макромолекул.— М.: Мир, 1973.
Козман У. Введение в квантовую химию.— М.: ИИЛ, 1960.
Ингрем Д. Электронный парамагнитный резонанс в биологии.— М.: Мир, 1972.
Лундин А. Г., Федин Э. И. Ядерный магнитный резонанс. Основы и применения.— Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1980.

К главе 6
Волькенштейн М. В. Молекулярная биофизика.— М.: Наука, 1975.— Гл. 6, 7.
Блюменфельд Л. А. Проблемы биологической физики.— М.: Наука, 1977.
Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики.— М.: Мир, 1979.
Ленинджер А. Биохимия.— М.: Мир, 1974.
Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии.— М.: Мир, 1972.

К главам 7 и 8
Волькенштейн М. В. Молекулярная биофизика.— М.: Наука, 1975.— Гл. 8 и 9.
Волькенштейн М. В. Общая биофизика.— М.: Наука, 1978.— Гл. 1.
Уотсон Дж. Молекулярная биология гена.— М.: Мир, 1978.
Франк-Каменецкий М. Д. Самая главная молекула.— М.: Наука, 1983.
Спирин А. С. Молекулярная биология. Структура рибосом и биосинтез белка.— М.: Высш. шк., 1986.

К главе 9
Волькенштейн М. В. Общая биофизика.— М.: Наука, 1978.— Гл. 2.
Бриллюэн Л. Наука и теория информации.— М.: Физматгиз, 1960.
Хакен Х. Синергетика.— М.: Мир, 1980.
Пригожин И. Введение в термодинамику необратимых процессов.— М.: ИИЛ, 1960.
Глансдорф П., Пригожин И. Термодинамическая теория структуры, стабильности и флуктуаций.— М.: Мир, 1973.
Рубин А. Б. Термодинамика биологических процессов.— М.: Изд. МГУ, 1976.
Блюменфельд Л. А. Проблемы биологической физики.— М.: Наука, 1977.
Волькенштейн М. В. Энтропия и информация.— М.: Наука, 1986.

К главе 10
Волькенштейн М. В. Общая биофизика.— М.: Наука, 1978.— Гл. 1, 3.
Бергельсон Л. Д. Биологические мембраны.— М.: Наука, 1975.
Поликар А. Молекулярная цитология мембранных систем живой клетки.— М.: Мир, 1972.
Биологические мембраны: Сб. статей/Под ред. Д. С. Парсонса.— М.: Атомиздат, 1978.
Веренинов А. А. Транспорт ионов через клеточные мембраны.— Л.: Наука, 1978.
Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт.— М.: Мир, 1980.
Маркин В. С., Чизмаджев Ю. А. Индуцированный ионный транспорт.— М.: Наука, 1974.
Овчинников Ю. А., Шкроб А. М., Иванов В. Т. Мембрано-активные комплексоны.— М.: Наука, 1974.

К главе 11
Волькенштейн М. В. Общая биофизика.— М.: Наука, 1978.— Гл. 4.
Катц Б. Нерв, мышца и синапс.— М.: Мир, 1968.
Ходжкин А. Нервный импульс.— М.: Мир, 1965.
Ходоров Б. И. Общая биология возбудимых мембран.— М.: Наука, 1975.
Ходоров Б. И. Проблемы возбудимости.— Л.: Медицина, 1969.
Тасаки И. Нервное возбуждение.— М.: Мир, 1971.
Маркин В. С., Пастушенко В. Ф., Чизмаджев Ю. А. Теория возбудимых сред.— М.: Наука, 1981.
Фултон А. Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки.— М.: Мир, 1987.

К главе 12
Волькенштейн М. В. Общая биофизика.— М.: Наука, 1978.— Гл. 5.
Бендолл Дж. Мышцы, молекулы и движение.— М.: Мир, 1970.
Катц Б. Нерв, мышца и синапс.— М.: Мир, 1968.
Дещеревский В. И. Математические модели мышечного сокращения.— М.: Наука, 1977.
Александер Р. Биомеханика.— М.: Мир, 1970.

К главе 13
Волькенштейн М. В. Общая биофизика.— М.: Наука, 1978.— Гл. 6.
Блюменфельд Л. А. Проблемы биологической физики.— М.: Наука, 1977.
Ленинджер А. Биохимия.— М.: Мир, 1974.
Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах.— М.: Наука, 1972.
Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке.— М.: Наука, 1969.
Рубин А. Б., Шинкарев В. П. Транспорт электронов в биологических системах.— М.: Наука, 1984.
Николс Дэвид Дж. Биоэнергетика. Введение в хемиосмотическую теорию.— М.: Мир, 1985.

К главе 14
Волькенштейн М. В. Общая биофизика.— М.: Наука, 1978.— Гл. 7.
Биофизика фотосинтеза, Сб. статей/Под ред. А. Б. Рубина.— М.: Изд. МГУ, 1975.
Чернавская Н. М., Чернавский Д. С. Туннельный транспорт электронов в фотосинтезе.— М.: Изд. МГУ, 1977.
Блюменфельд Л. А. Проблемы биологической физики.— М.: Наука, 1977.
Конев С. В., Болотовский И. А. Фотобиология.— Минск: Изд. БГУ, 1979.

К главам 15 и 16
Волькенштейн М. В. Общая биофизика.— М.: Наука, 1978.— Гл. 8.
Глансдорф П., Пригожин И. Термодинамическая теория структуры, стабильности и флуктуаций.— М.: Мир, 1973.
Николис Г., Пригожин И. Самоорганизация в неравновесных системах.— М.: Мир, 1979.
Андронов А. А., Витт А. А., Хайкин С. Э. Теория колебаний.— М.: Физматгиз, 1959.
Иваницкий Г. Р., Кринский В. И., Сельков Е. Е. Математическая биофизика клетки.— М.: Наука, 1978.
Жаботинский А. М. Концентрационные автоколебания.— М.: Наука, 1974.
Хакен Х. Синергетика.— М.: Мир, 1980.
Эбелинг В. Образование структур при необратимых процессах.— М.: Мир, 1979.
Вольтерра В. Математическая теория борьбы за существование.— М.: Наука, 1976.
Рубин А. Б., Пытьева Н. Ф., Ризниченко Г. Ю. Кинетика биологических процессов.— М.: Изд. МГУ, 1987.
Маркин В. С., Пастушенко В. Ф., Чизмаджев Ю. А. Теория возбудимых сред.— М.: Наука, 1981.
Романовский Ю. М., Степанова Н. В., Чернавский Д. С.— Математическая биофизика.— М.: Наука, 1984.
Пригожин И. От существующего к возникающему.— М.: Наука, 1985.
Синергетика: Сб статей.— М.: Мир, 1984.
Кринский В. И., Михайлов А. С. Автоволны.— М.: Знание, 1984.

К главе 17
Волькенштейн М. В. Общая биофизика.— М.: Наука, 1978.— Гл. 9.
Николис Г., Пригожин И. Самоорганизация в неравновесных системах.— М.: Мир, 1979.
Опарин А. И. Возникновение жизни на Земле.— М.: Изд-во АН СССР, 1957.
Бернал Дж. Возникновение жизни.— М.: Мир, 1969.
Кальвин М. Химическая эволюция.— М.: Мир, 1971.
Эйген М. Самоорганизация материи и эволюция биологических макромолекул.— М.: Мир, 1973.
Эйген М., Винклер Р. Игра жизни.— М.: Наука, 1979.
Эйген М., Шустер П. Гиперцикл.— М.: Мир, 1981.
Эбелинг В. Образование структур при необратимых процессах.— М.: Мир, 1979.
Романовский Ю. М., Степанова Н. В., Чернавский Д. С. Математическая биофизика.— М.: Наука, 1984.

Шмальгаузен И. И. Кибернетические вопросы биологии.— Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1968.
Шмальгаузен И. И. Факторы эволюции.— М.: Наука, 1968.
Шмальгаузен И. И. Проблемы дарвинизма.— М.: Наука, 1969.
Кастлер Г. Возникновение биологической организации.— М.: Мир, 1967.
Вилли К., Детье В. Биология.— М.: Мир, 1974.
Тимофеев-Ресовский Н. В., Воронцов Н. Н., Яблоков А. В. Краткий очерк теории эволюции.— М.: Наука, 1977.
Грант В. Эволюция организмов.— М.: Мир, 1980.
Пригожин И. От существующего к возникающему.— М.: Наука, 1985.
Романовский Ю. М., Степанова Н. В., Чернавский Д. С. Математическая биофизика.— М.: Наука, 1984.
Эволюция.— М.: Мир, 1981.
Айала Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику.— М.: Мир, 1984.
Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности.— М.: Мир, 1985.
Рэфф Р., Кофмен Т. Эмбрионы, гены и эволюция.— М.: Мир, 1986.
Марчук Г. И. Математические модели в иммунологии.— М.: Наука, 1986.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Автоволны 374, 515, 519, 521, 528 и далее
Автокатализ 329, 494, 498 и далее, 538
Автоколебания 411, 522, 526
Аксоплазма 361, 366
Активность 28
— оптическая индуцированная 157
— — скрытая 159
Актин 393 и далее
Аллостеризм 87, 203, 204
Альфа (α)-спираль 89, 90, 99, 109, 111—115
Анализ рентгенодинамический 134, 191
Антиподы зеркальные 43, 44, 152
Антитела моноклональные 126
Апофермент 43
Ароморфозы 556
Аспартат-аминотрансфераза 133, 157, 184, 186, 187, 196
АТФ 40, 41, 52—54, 87, 332—334, 346 и далее, 392 и далее, 416, 423 и далее
АТФ-аза 41, 87, 346, 347, 392, 397, 416, 440
Ацетилхолин 382

Барьер потенциальный 62, 63. 93
Бета (β)-форма 89, 91, 109, 111, 115, 116
Биолюминесценция 21, 480—482
Бионика 422
Биотехнология 221
Биоэлектроника 480
Бифуркация 492
Брюсселятор 500, 501

Взаимодействие гем-гем 206
Взаимодействия вертикальные 232, 233
— гидрофобные 58, 104—109, 114, 285
— ион-дипольные 55
— электронно-конформационные 194, и далее, 210, 219, 349, 384, 439—444
Вискозиметрия 79
Витализм 11
Вкус 356—358
Вода 94—99
— «активированная» 98
— «диспергированная» 98
— «живая» 98
— «мертвая» 98
— «омагниченная» 98, 208
— талая 98
Вращение оптическое магнитное 159—161
Время релаксации 98, 322, 381, 441, 476
Высокоэластичность 59
Выход квантовый 455
Вязкость 79, 85, 99, 100, 239

Галобактерии 477
Гаптены 123, 124
Гем 50, 163, 206, 444
Гемоглобин 35, 36, 50, 87, 104, 113, 157. 206—215, 217
Гибкость киветическая 73
— термодинамическая 69, 72, 73, 77
Гибридомы 126
Гипохромизм 142—144
Гистоны 294
Гликоген 54
Гликолиз 52, 54, 522—525
Гомеорез 319, 512
Гомеостаз 319, 512
Граны 458

Дейтерообмен 112, 165
Деление клетки 573
Делеции 259, 260
Денатурация белков 88, 107, 117—121, 133, 198 и далее
— ДНК 233—243
Деполяризация 365, 420
Диаграмма Дебая — Шерера 136
Дислокация 354
Дихроизм инфракрасный 165
— круговой 148—154, 157, 158, 228

Дихроизм круговой магнитный 159—161, 213
— линейный 158
Дифференциация 573 и далее
Длина персистентная 77, 228, 231, 256
Домены 109, 114, 297
Дополнительность 11, 12
«Дыба» 193

Единица фотосинтетическая 448

Жесткость торсионная 256
Жгутики 355, 412, 413

Закон Аррениуса 19, 173, 176
— Бугера — Ламберта — Бэра 141, 149
— Вавилова 145
— Вант-Гоффа 79
— второй Ньютона 16, 405
— Гука 60, 68, 75
Законы Холдейна 215
Запах 355—357
Зет (*z*)-форма ДНК 224, 256

Идиоадаптация 556
Избыточность информации 306, 562—564
Излучение синхротронное 138, 411
Изоклины 488
Изомерия дисторсионная 218
— поворотная 65
Изотерма Ленгмюра 179, 209
Иммунитет 22, 122—126, 513, 578—582
Ингибирование 180
Инженерия белковая 88
Интеркаляция 248
Интроны 297
Информация 10, 14, 20, 45, 301—307, 331, 561, 572
— позиционная 574
Ион диполярный 25
Иониты 85
Ионофоры 351, 352

Каналы ионные 351, 366, 371, 378—381, 420, 474
Канцерогенез 22, 221
Каротиноиды 450, 482
Кератин 128, 129
«Кинки» 339, 354, 378
Коацерваты 537, 552
Код бубновый 258, 259
— генетический 220, 221, 258—262, 547, 548
Колбочки 463 и далее
Колицины 539
Коллаген 92, 126—128, 135, 421
Компартментация 24, 332, 493, 537, 552, 576—578
Комплексы Грина 428
Константа Михаэлиса 178, 179
Конфигурация 66
Конформация 61 и далее
Конформон 198, 340, 442, 443
Координата реакции 309
Кофакторы 48—50, 182
Коэффициенты феноменологические 310
Кристалл апериодический 12, 88, 326, 563
Кристаллы жидкие 135, 337, 396, 404, 475
Кристы 429, 430

Лак-оперон 287
Лауэграмма 131
Липиды 47, 334—338
«Лист клеверный» 269, 271
Лучи митогенетические 148
Люминесценция 144—148, 172, 190
Люцифераза 480 и далее
Люциферин 480 и далее

Магнитобиология 208
Металлы 24, 215—219, 267, 568
Метки спиновые 172
Метод изоморфного замещения 132
— кинетический формальдегидный 244, 245, 266
— Крамерса и Ваннье 73, 101—103
— Максама — Гилберта 269
Механорецепция 411, 415 и далее
Механохимия 10, 388, 389, 431, 576—578
Миелин 359, 367
Микрокалориметрия 112, 240
Миксомицеты 414, 575
Миоглобин 34, 50, 87, 113, 114
Миозин 390—396, 402 и далее
Миофибрилла 392, 393
Митохондрии 87, 333, 423 и далее
Модель Изинга 73, 101, 109
— «ключ — замок» 189
— косвенной кооперативности 201, 202
— Лилли 369
— Максвелла 410
— мембраны мозаичная 335, 336
— — унитарная 334, 335
— Моно, Уаймана, Шанжё 201, 202, 340
— одноэлектронная 154
— скользящая мышцы 396
— Тьюринга 501—505, 575, 576
— Фойгта 410
— «хищник — жертва» 494 и далее
Модуль Юнга 112, 113, 198, 577
Момент дипольный 55, 56, 163
— — переходный 142, 151
— магнитный переходный 151
Морфогенез 358, 415, 573, 574

Морфогены 576
Мутации 35, 228, 258—262
— гомеотические 298
— сдвига рамки 260—262
Мышцы летательные насекомых 410, 411, 493

Начало второе термодинамики 17, 308, 309, 326
Насос натриевый 346, 347
— протонный 435
Нейромедиаторы 385
Нейроны 359, 360 и далее
Нейтронография 96, 138, 139
Неустойчивость 484, 554
Нуклеозиды 38
Нуклеосомы 227, 294—296
Нуклеотиды 38, 39

Омматидии 466, 468, 469
Онтогенез 10, 22, 221, 331, 415, 573—578
Оперон 287, 288
Орегонатор 518, 519
Осмометрия 79
Осциллятор гармонический 57, 487—490
— Теорелла 525
Отталкивание молекулярное 63

Палиндромы 256, 297
Палочки 334, 463 и далее
Память иммунная 580
Параметр кооперативности 101
Пары уотсон-криковские 222, 223
Переносчики 326, 346, 351, 353
Переход фазовый 73, 78, 99, 104, 235, 326, 338, 475, 484, 505—509, 555—557, 582
Петли 230, 236, 239, 270
Плазмиды 268, 298
Поле морфогенетическое 575, 576
Поликонденсация 59, 316, 537
Полимеразы 250, 251
Полимеризация 59, 537
Полупроводимость 141, 457
Поляризация люминесценции 145
Поляризуемость 57, 71, 150, 151, 163, 352
Портрет фазовый 487 и далее
Порфирины 49, 50, 162
Порядок зацепления 254
Потенциал действия 360
— Леннард-Джонса 64, 93
— электрохимический 342
Потенциалы атом-атомные 64
Поток обобщенный 308
Прецессия Лармора 159, 167
Принцип Гамильтона 16
— Кюри 312, 346
— Ле Шателье 16
Принцип Ферма 16
Протеиноиды 537, 559
Протеолиз 112, 121
Процессинг 297, 298
Процессы стохастические 486
Пунктуализм 556, 557

Рабдомеры 469
Равновесие Доннана 344
Разобщители 431, 432, 436
Распределение Больцмана 65, 168, 304
Рассеяние комбинационное 66, 163
— резонансное 166
— рентгеновских лучей 21, 136, 137
— света 21
Раствор буферный 31
Расщепление давыдовское 142
Реакция Красновского 450
— Ломанна 398
— Хилла 450
Реверберераторы 520, 521, 530—533
Ревертаза 267
Резонанс электронный парамагнитный 21, 112, 171, 172, 190, 218, 219, 337, 475
— ядерный магнитный 21, 66, 167, 171, 190, 337
Релаксация конформационная 438—441, 443
— спин-решеточная 168
— спин-спиновая 169
Ренатурация белков 108
— ДНК 245, 246
Рентгенография 89, 96, 98, 113, 127—136, 138, 190—192, 474
Реполяризация 366, 370
Ретикулум саркоплазматический 392, 397
Рефрактерность 363, 529—531
Рибосомы 221, 263, 264, 272—275 и далее
Ритмы циркадные 514
Родопсин 337, 470 и далее
Ротамеры 65, 338

Сайзер 552
Самоорганизация 485, 538 и далее
Самосборка 104, 108, 109, 273, 549
Саркомер 393, 400, 401
Связи ионные 55
Связь водородная 58, 89, 94—99, 139, 222 и далее
— пептидная 32
Сдвиг химический 169
Седиментация 21, 79—82
— в градиенте плотности 238, 248, 251
Сила вращательная 151, 158
— ионная 85
— обобщенная 308

Сила осциллятора 142, 144
Силы дисперсионные 56, 57
— изображения 351
— индукционные 56
— ориентационные 56
Синапс 382
Синергетика 331, 483, 485
Синтез гена 40
— индуцированный 289
Синцитии 369
Система диссипативная 326, 483, 485, 561
Скрепки 236
Смесь рацемическая 43, 44, 536
Создание информации 306, 543, 568
Сокращение изометрическое 398
— изотоническое 398, 399
Солитон 374, 403
Соответствие структурное 189
— — индуцированное 189
Сополимер 15, 111
Сопряжение косвенное 323
Спайк 360
Спектр действия 451
Спектры колебательные 95, 96, 163—166
— электронные 140—148
Сплайсинг 297
Среда активная 374, 519
— возбудимая 22, 374, 519, 528
Сродство 309, 310, 313, 320
Структура Бенара 331
— вторичнав 89 и далее
— первичная 32—36
— третичная 104 и далее
— четвертичная 104, 113, 206—215
Супрессоры 259, 260
Схема валентно-оптическая 163

Таутомерия 37, 188, 283
Текстура 135
Тельце Пачини 415, 416, 420
Теорема Борна и Оппенгеймера 163
— Гёделя 570
— Ландау и Лифшица 104, 235
— Онзагера 310, 317
— Пригожина 317, 320, 327, 484
Теория абсолютных скоростей реакций 66, 174, 175, 252, 405
— графов 205
— Дебая — Хюккеля 29
— Дещеревского 404, 405, 409
— катастроф 492
— клонально-селекционная 578
— конформационная макромолекул 69—73
— Митчелла 432—438, 461, 462
— поля лигандов 207, 216
— систем 512
— управления 463
— цепей Маркова 486
Теория Хаксли 404
— Ходжкина — Хаксли 369—371, 381
— эволюции нейтральная 112, 558—561
— Эйгена 538—541, 544—548, 551
Термодиффузия 311
Тиксотропия 414
Тилакоиды 333, 454 и далее
Ток ворот 379, 381
Топоизомераза 255
Топоизомеры 257
Точка Кюри 505
Точки особые 488 и далее
Транс-влияние 219
Транскриптон 297
Транскрипция 221, 251, 262, 266 и далее
— обратная 221, 263, 266, 267
Трансляция 264, 272—276
Транспозон 298
Транспорт облегченный 346
Трансформация бактерий 220
Тропомиозин 395
Тропонин 395
Туннелирование 176, 440—443, 462, 478, 479

Узнавание молекулярное 10, 108, 265, 287, 356, 580
Узнавание клеток 358, 580
Ультразвук 112, 420, 416
Упругость энтропийная 61, 68
Устойчивость 16, 491
Уравнение Ван-дер-Ваальса 58, 73, 507
— Нернста 344
— основное кинетическое 509—511
— Фика 82
— Хилла (гемоглобин) 209
— — (мышца) 399, 400, 405, 409, 560
— Ходжкина — Хаксли 345, 372, 527
Ухо 417, 418

Феромоны 355
Фибрилляция сердца 513, 530—533
Форма кольцевая ДНК 254
Формула Аррениуса 173, 182, 244, 354
— Беккереля 153, 160
— Брэгга — Вульфа 130
— Друде 155
— Левшина — Перрена 145
— Лоренц — Лоренца 150
— Михаэлиса — Ментен 178, 179, 200
— Моффита 155—157
— Ока 69, 70
— Шеннона 303
— Эйринга 175
Фосфорилирование 54, 333, 426, 431
Фототаксис 467

Хемилюминесценция 148
Химия бионеорганическая 20, 23, 215—219, 268
— биоорганическая 20, 23
Хиральность 42—46, 157, 158, 548, 551
Хлоропласты 333, 450, 457 и далее
Хлорофилл 50, 449 и далее
Холофермент 48
Хроматография 33
Хромосомы 221, 263, 294, 295, 299

Целлюлоза 46, 47
Ценность аминокислотных остатков 566, 567
— информации 545, 561, 562, 567, 568, 572
— кодонов 564, 565
— селективная 539, 540
Центры ведущие 519, 520, 531
Цепи Маркова 554
Цепь дыхательная 425—427 и далее
Цикл Кальвина 456, 457
— Кребса 424, 545
— предельный 493
Циклический (ц) АМФ 42, 289, 358, 385, 386, 576
— (ц) ГМФ 474
Циклы механохимические 388, 389
Цитоскелет 414, 415
Цитохром *с* 35, 162, 425 и далее, 444—446, 566, 567

Часы биологические 514
Число координационное 97, 99
— супервитков 254

Экзон 297
Экситон 143
Электронография 66
Электрострикция 116
Электрофорез 33, 86
Энантиомеры 43, 44
Эффект Бора 209, 214
— динамооптический 83
— Зеемана 159
— Керра 84
— компенсационный 181
— Мёссбауэра 21, 139, 140, 213, 221
— Ми 83
— Фарадея 159, 162, 163
— Фенна 402
— Эмерсона 451—453
— Яна — Теллера 217
Эффекты объемные 77, 84

Михаил Владимирович Волькенштейн
БИОФИЗИКА

Редактор *Л. П. Русакова*
Художественный редактор *Т. Н. Кольченко*
Технический редактор *С. Я. Шкляр*
Корректоры *Т. С. Вайсберг, Л. С. Сомова*

ИБ № 32604

Сдано в набор 14.03.87. Подписано к печати 18.12.87. Формат 60×90$^{1}/_{16}$. Бумага книжно-журнальная. Гарнитура обыкновенная новая. Печать высокая. Усл. печ. л. 37. Усл. кр.-отт. 37. Уч.-изд. л. 38,92. Тираж 13 400 экз. Заказ № 738. Цена 3 р.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Наука»
Главная редакция физико-математической литературы
117071 Москва В-71, Ленинский проспект, 15

4-я типография издательства «Наука»
630077 Новосибирск, 77, Станиславского, 25

Отсканировал Семенюченко Владимир
chem_vova@mail.univ.kiev.ua; vova2002@mail.ru

М. В. ВОЛЬКЕНШТЕЙН

БИОФИЗИКА