

А. СЕНТ - ДЪЕРДЪИ

Ъ ИОЭНЕРГЕТИКА



СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ФИЗИКИ

*Серия выпускается под общим руководством
редакционной коллегии журнала
«Успехи физических наук»*

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО
ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
МОСКВА 1960

БИОЭНЕРГЕТИКА

ПЕРЕВОД С АНГЛИЙСКОГО
П. Л. ПРИВАЛОВА

ПОД РЕДАКЦИЕЙ
Л. А. ТУМЕРМАНА

С предисловием
акад. А. Н. ТЕРЕНИНА

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО
ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
МОСКВА 1960

BIOENERGETICS

ALBERT SZENT-GYÖRGYI

ACADEMIC PRESS INC.
NEW YORK 1967

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие А. Н. Теренина	6
Предисловие автора	11
Список условных обозначений	14

ЧАСТЬ I

ОБЩИЕ СООБРАЖЕНИЯ

1. Постановка проблемы	17
2. Теория передачи энергии	21
3. Мобильность E^* и организация	24
4. Абсорбция, флуоресценция и фосфоресценция	32
5. Триплеты и вода	41
6. Возбуждение и биологическая матрица	48
7. Тушение и тушители	57
8. Различные наблюдения	63

ЧАСТЬ II

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ

9. Теория мышечного сокращения	75
10. Молекула АТФ	79
11. Рибофлавин	88
12. Ионы, глутатион, сахара и спирты	94
13. Об окислительном фосфорилировании и его расщеплении	104
14. Деполяризация клеточной мембраны	113

ЧАСТЬ III

О ЛЕКАРСТВАХ, ГОРМОНАХ И БОЛЕЗНЯХ

15. Общие замечания о лекарствах и болезнях	121
16. О йоде и хлорпромазине	125
17. О миотонии	132
18. О тимусе	139
19. Об окислении, ферментации и раке	144
20. Заключение	149
Литература	152

ПРЕДИСЛОВИЕ А. Н. ТЕРЕНИНА

Имя автора настоящей книги Альберта Сент-Дьердьи хорошо известно как имя лауреата Нобелевской премии 1937 г. за исследования в области биохимии дыхания и витаминологии. В дальнейшем его работы были посвящены проблемам химизма мышечного сокращения и энергетики биологических процессов.

Сент-Дьердьи известен также как весьма активный, темпераментный пропагандист своих взглядов на основы биохимических и физиологических процессов. Популярное изложение его соображений по фундаментальным вопросам биологии подаются им в столь увлекательной литературной форме, что они невольно захватывают читателя и заставляют его задуматься над принципами биологической динамики. Такова его первая книга «Химия мускульного сокращения» (1947 г.). Тот же характер имеет данная книга, носящая название «Биоэнергетика» и вышедшая 10 лет спустя.

Необходимо сразу же предупредить читателя, что он не найдет в настоящей книге развернутого и сколько-нибудь систематического изложения проблем энергетики биологических процессов. Главы книги представляют собой лишь отдельные наброски или эскизы, непосредственно между собой не связанные и относящиеся к весьма различным областям биологических явлений, о чем свидетельствуют заголовки. Автор книги тем не менее стремится объединить все или по крайней мере большинство затрагиваемых им фактов, трактуя их с позиций выдвигаемой им гипотезы или, точнее, нескольких гипотез. Основная гипотеза формулируется им как наличие двух различных видов энергии в биологических явлениях, а именно: «неподвижной» энергии валентных связей, запасенной в химических соединениях, и «подвижной» энергии, передаваемой, «мигрирующей» в биохими-

ческих процессах. Дополнительная гипотеза автора заключается в предположении об особой структуре воды, находящейся в связанном состоянии в биологических объектах и представляющей собой не только своего рода «жесткую» среду, но также среду, благоприятствующую накоплению и распространению «подвижной» энергии. Эта последняя отождествляется автором с энергией электронного возбуждения молекул или систем молекул, входящих в состав белков, нуклеиновых кислот и других компонент живого вещества.

Успехи современной теоретической и прикладной биохимии и фармакологии значительны и многообещающи. Однако в их развитии все настоятельнее возникают требования более глубокого осмысливания полученных результатов, чем это делают формальная трактовка энергетики биохимических реакций с помощью термодинамики, а также феноменологическое описание действия физиологически активных средств. Изучение итогового, суммарного процесса уже не доставляет удовлетворения исследователю.

В этом отношении книга Сент-Дьердьи отражает неудовлетворенность современной биохимии классическими приемами исследования и ее тенденцию углубиться в понимание строения молекулярных форм, участвующих в реакции, детального механизма их превращения, стремление выявить те промежуточные преходящие образования — активные молекулы, радикалы, нестойкие соединения, — через посредство которых фактически развивается всякая реакция, в том числе и биохимическая.

Для возможности предсказания и сознательного изменения хода реакций оказываются необходимыми более изощренные приемы исследования, затрагивающие именно молекулярную динамику, лежащую в основе биохимического превращения. Вот почему Сент-Дьердьи ищет и находит новые идеи и методы в современной физике и химии, столь успешно изучающих строение молекул и элементарные реакции превращения энергии, разыгрывающиеся в атомном и молекулярном масштабах.

Это стремление делает понятным, почему для распознания принципов биоэнергетики автор книги обратился к кругу физических явлений, наблюдаемых при люминес-

ценции красителей в растворах и на первый взгляд не имеющих прямого отношения к биологии. Действительно, люминесценция молекул, вызываемая поглощаемой ими световой энергией, подводимой от внешнего источника, издавна служит у физиков весьма тонким средством изучения внутримолекулярного превращения энергии возбуждения и процессов междумолекулярного ее переноса.

Необходимо, однако, отметить, что Сент-Дьердьи в своем увлечении красивыми, весьма наглядными и доходчивыми опытами по люминесценции не избег опасности чрезмерно упрощенной и подчас наивной трактовки наблюдений. Поэтому нельзя доверяться убедительности допускаемой им далекой экстраполяции из круга заманчивых явлений флуоресценции и фосфоресценции на несравненно более сложную как в структурном, так и в физико-химическом отношении область биохимических процессов. В этом отношении многие из выводов автора книги не могут считаться признанными и требуют более углубленной экспериментальной проверки.

Изложенная в первой книге Сент-Дьердьи «Химия мускульного сокращения» попытка провести глубокую аналогию между белком и неорганическими полупроводниками, обладающими обобществленными «зонами» энергетических уровней, была не новой. Некоторые физики, заинтересовавшиеся вопросами биологии (Иордан, Риль и др.), выдвигали подобные же представления. Однако первый же теоретический расчет вскоре показал, что обобществленные уровни энергии в белке, если они существуют, должны быть очень высоко расположенными и тем самым не могут быть достигнуты в нормально протекающих биологических процессах в отсутствие воздействия излучения.

Фосфоресценция красителей в желатине, использованная Сент-Дьердьи как один из аргументов в пользу своей первоначальной гипотезы, отнюдь не обусловлена существованием обобществленных уровней энергии в желатине, по которым мигрирует энергия, а свойственна изолированным молекулам красителя, находящимся в результате возбуждения светом на длительном метастабильном — триплетном уровне.

В новой своей книге Сент-Дьердьи проявляет большую осведомленность о механизме фосфоресценции органических

соединений и правильно сопоставляет ее с наличием у молекул триплетного уровня энергии, расположенного ниже кратковременно занимаемого синглетного уровня возбуждения. Однако теперь в своем увлечении найденной им разгадкой биоэнергетики Сент-Дьердьи впадает в другую крайность. В самом деле, он стремится объяснить достаточно сложные биологические явления наличием триплетного уровня энергии и его поведением в различных условиях. В частности, действие физиологически активных средств рассматривается им как затрагивающее только триплетный уровень энергии биологической системы. При этом проводится неубедительная аналогия между поведением триплетного состояния фосфоресцирующих молекул некоторых красителей в замороженном водном растворе и ответом живого организма на воздействие данного активного средства. Сложная, существенно неоднородная структура живых тканей игнорируется, и весь организм уподобляется автором однородной среде, в которой распределены молекулы активного средства подобно его раствору в пробирке!

Основное затруднение, испытываемое автором, а также читателем, заключается в расплывчатости выдвигаемого представления о триплетном состоянии в отношении биологической системы как целого. Далее, представляется крайне неубедительным, чтобы такое триплетное состояние биологической системы, например белка, по своему поведению, по своей физиологической реакции уподоблялось поведению триплетного уровня совершенно отличных от белка по своей структуре красителей, таких, как родамин или акридиновый оранжевый. Более того, «стимулирующие» и «тушащие» воздействия добавок на фосфоресценцию красителей в замороженном водном растворе, качественно описываемые автором книги, а также не относящиеся непосредственно к данному вопросу смещения спектра поглощения допускают во многих случаях и иные, более физико-химически приемлемые объяснения, чем объяснения автора этой книги, всецело поглощенного применениями своей идеи.

В предисловии не место, разумеется, для развернутой критики этих экспериментов и выводов Сент-Дьердьи. Появление триплетных (бирадикальных) состояний, радикалов и ион-радикалов в биохимических, в частности

ферментативных, процессах рассматривалось автором настоящего предисловия в докладе на Первом Всесоюзном совещании по фотосинтезу еще в 1946 г. В последние годы это предположение высказывалось многими авторами и получило подтверждение в опытах с парамагнитным резонансом. Мы также располагаем теперь количественными данными по переносу энергии по триплетным уровням соседних органических молекул, которые должны учитываться при рассмотрении подобных гипотез. Возможность миграции энергии по триплетным уровням в белке правдоподобна, а перенос энергии возбуждения по синглетным уровням ароматических аминокислот, а от них гему доказан. Индуктивный (резонансный) перенос энергии такого типа, наблюдаемый в флуоресцирующих красителях, оказался широко распространенным и при возбуждении белковых систем и хромопротеидов радиацией различного вида. Необходимо, однако, быть осторожным в попытках проведения чрезмерно тесной аналогии между явлениями люминесценции в молекулах, возбуждаемыми большими квантами видимого и ультрафиолетового света, и процессами превращения энергии в биохимических реакциях, требующими в 5—10 раз меньшей энергии термической активации.

Значение книги Сент-Дьердьи не в том, что она стремится дать исчерпывающее объяснение биоэнергетики, которого она на самом деле не дает, а в том, что она обращает внимание читателя на некоторые вопросы биохимии, настоятельно ждущие решения. Книга эта побуждает читателя задуматься над проблемами биофизики и биохимии и стимулирует не только к критике автора и его слишком далеко идущих выводов, но также и к постановке новыми методами экспериментов, более непосредственно затрагивающих существо биологических явлений.

Нельзя подходить к книге Сент-Дьердьи с тем же мерилом, с каким мы подходим к обычной научной монографии. Она в полном смысле слова является увлекательной «научной поэмой», подкупающей читателя своей искренностью, вводящей неподготовленного читателя в круг интересных вопросов биологии.

А. Теренин

ПРЕДИСЛОВИЕ АВТОРА

Существует только один верный путь избежать ошибок: не делать ничего или, по крайней мере, стараться не делать ничего нового. Это, однако, само по себе уже есть величайшая из ошибок. Избранники, которые способны без ошибок открывать новые пути в науке, очень редки, и автор, несомненно, не принадлежит к их числу. В области неизвестного точки опоры ненадежны, и тот, кто вступает сюда, не может надеяться на большее, чем на то, что его возможные ошибки будут почетными.

Одной из наиболее характерных черт современной биохимии является сосуществование ярких бликов и глубоких теней, знания и невежества. Хотя мы в состоянии осуществлять реакции, которые граничат с чудом и в отдельных случаях превосходят природу, мы не можем ответить на многие простейшие и самые фундаментальные вопросы. Мы имеем, например, очень детальные сведения о структуре молекул белков, но мы не можем сказать, для чего природа соединила эти атомы таким совершенно специфическим образом, каковы те качества, которых она хотела при этом достичь. То же относится и к нуклеиновым кислотам и нуклеопротеинам. Мы знаем много гормонов, и многие из них мы умеем синтезировать сами, вне живого организма. В некоторых случаях мы умеем даже создавать агенты более активные, чем природные. Но как действуют гормоны, что они делают на молекулярном уровне, этого мы не знаем; в анализе их действия мы не пошли дальше симптоматологии. То же верно и относительно большинства наших лекарств.

Такая же двойственность существует и в том, что мы знаем о макроэргических, т. е. обладающих большим запасом энергии, химических связях, главным представителем

которых является макроэргическая фосфатная связь $P-O-P$. Мы будем для краткости обозначать эту связь символом $\sim P$. Открытие этих связей было, вне всякого сомнения, одним из самых блестящих достижений современной биохимии. Мы знаем, как за счет одной $\sim P$ устанавливается другая эндоэргическая связь. Мы знаем, как в процессе ферментации смещаются связи в фосфатах гексозы или триозы, пока P -связи не превратятся в $\sim P$, энергия которых, перенесенная к аденозиндифосфату (АДФ), может поддерживать эндоэргические процессы синтеза. Мы обладаем поразительными знаниями о процессах, в которых наши пищевые вещества используются, чтобы строить наше тело, воздвигать здание жизни, конструировать ее механизм; но как энергия приводит в движение эту машину, как производится работа (w), будь то работа механическая, осмотическая или электрическая, одним словом, как энергия *управляет* жизнедеятельностью — этого мы не знаем. Ослепленные нашими успехами, мы часто даже забываем ставить такие вопросы.

Эта «светотень» (*«chiaroscuro»* *) и представляет собой одну из самых характерных черт современной биохимии. Такое переплетение известного и неизвестного указывает на то, что нам не хватает какой-то весьма существенной информации. Данная книга и содержит догадку об ее природе.

Исследование этой двойственности необходимо и актуально по следующей причине. Большим провалам в нашем понимании соответствуют столь же большие провалы в медицинских науках. В настоящее время человечество больше всего страдает от так называемых «дегенеративных болезней». Этот термин означает: «болезни, которых мы не понимаем и с которыми мы, следовательно, ничего не можем сделать». Существование такой замкнутой группы болезней также указывает на какой-то большой дефект в наших фундаментальных знаниях. Возможно, что все эти провалы, относящиеся к нормальным функциям организма или к его заболеваниям, имеют один общий знаменатель, какой-то

*) В живописи и графическом искусстве под термином *«chiaroscuro»* («светотень») разумеют сочетание ярких бликов и глубоких теней, какое мы часто встречаем, например, в картинах Рубенса.

процесс, который до сих пор оставался невыясненным. Нашему биологическому мышлению не хватает какого-то фундаментального факта, если не нового аспекта.

Проторенные пути в науке часто оказываются тупиковыми, и единственный здоровый подход к фундаментальным вопросам лежит на уровне наших основных знаний. Способы лечения болезней вытекают из прогресса нашего понимания их как естественные плоды знания. Эта мысль и будет лейтмотивом данной книги, которая содержит попытку выявить недостающее звено в наших знаниях и открыть подход к его изучению.

Июль 1956 г.

Альберт Сент-Дьердьи

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Å	— ангстрем = 10^{-8} см.
АДФ	— аденозиндифосфат.
АТФ	— аденозинтрифосфат.
2,4Д	— 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота.
E^*	— энергия электронного возбуждения.
(E)	— энергия химических связей.
ИДФ	— инозиндифосфат.
MV	— молекулярный вес.
λ	— длина волны.
μ	— микрон = 0,001 мм.
м μ	— миллимикрон = $10 \text{ Å} = 10^{-6}$ мм.

ЧАСТЬ I

ОБЩИЕ СООБРАЖЕНИЯ

Много есть вещей в небесах и на земле, Горацио, которые не снились вашим философам.

Шекспир, «Гамлет»

1. ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМЫ

Проблема ставится так: каким образом энергия управляет жизнедеятельностью? как она приводит в движение живую машину? Это одна из наиболее важных проблем биологии, и до сих пор она остается без ответа. Таким образом, возможно, что то «*oscuro*» в биологии, о котором мы говорили в предисловии, обусловлено нашим неумением ответить на этот вопрос.

Чтобы не потеряться в дебрях общих рассуждений, возьмем конкретный пример. Я приведу небольшой эксперимент, осуществленный мной несколько лет тому назад. В этом эксперименте я взял полоску мышцы (я выбрал *musculus psoas* кролика), поместил ее в разбавленный глицерин и продержал ее в нем в течение нескольких дней в холодильнике, а затем в течение нескольких недель при глубоком охлаждении. После этого я погрузил ее в десятичный раствор KCl при комнатной температуре, добавил немного Mg и АТФ в той же концентрации, в какой мышца содержала его *in vivo*. Мышца сократилась и развила такое же натяжение, какое она максимально развивала в живом животном. Если мы отождествим жизнь с движением, то можем сказать: мышца вновь ожила. В этом процессе АТФ расщепился, потеряв свой конечный фосфат, связанный с ним с помощью связи $P-O-P$. Поскольку мы знаем, что эта связь является так называемой макроэргической фосфатной связью $\sim P$ и что нет иного донора энергии, то становится очевидным, что энергия, приводящая мышцу в движение, есть энергия этой связи $\sim P$. Поэтому мы можем сузить нашу проблему и поставить вопрос: каким образом энергия $\sim P$ приводит в движение мышцу?

Развитие химии мышцы дало возможность еще более упростить эту проблему. Почти два десятилетия тому назад

я показал, что сокращение мышцы по существу заключается во взаимодействии актомиозина (комплекс, состоящий из двух белков: актина и миозина) с АТФ и ионами. Из двух белков за элементарный акт сокращения ответствен миозин, так что мы можем упростить нашу задачу, рассматривая вместо всей мышцы только миозин, и поставить вопрос: каким образом энергия $\sim P$ производит движение миозина?

Мы знаем из работ Эдсалла и Вебера, что молекула миозина представляет собой тонкую нить. Не зная никаких других деталей, мы можем представить себе две различные картины процесса, в котором энергия $\sim P$ переносится к этой нити и производит ее сокращение. Одной из них будет предположение, что молекула, несущая эту $\sim P$ (в нашем случае АТФ), входит в какую-то химическую реакцию с миозином, в результате чего возникает локальное изменение в белке, ведущее к его складыванию. Возникает комплекс АТФ-миозин, который затем расщепляется, давая фосфат, АДФ и измененный миозин. Такая реакция имеет много аналогий с «реакциями группового переноса» в промежуточном метаболизме и в принципе может быть описана в символах классической химии.

Альтернативная картина основана на предположении, что молекула АТФ не вступает ни в какую локальную реакцию, но что связанная энергия ее $\sim P$ высвобождается и переходит в более активную и подвижную форму, в которой она затем переносится к молекуле миозина, движется по ней и порождает за собой изменения, которые каким-то образом ведут к сокращению и могут быть адекватно описаны лишь в рамках квантовой механики. По сравнению с первой эта картина не ясна и не имеет аналогий в промежуточном метаболизме; может возникнуть вопрос: для чего нужна такая туманная картина, если можно создать более ясную и имеющую глубокие корни в существующих знаниях?

Неадекватность прежней классической картины стала ясной в результате достижений химии миозина. Чем больше мы узнавали о миозине, тем меньше мы его понимали; это наводило на мысль, что мы подходили к нему по неправильному пути. Эндрью Сент-Дьердьи, продолжая работы Гергели, Перри и Михали, показал, что молекула миозина построена из двух видов подъединиц — «меромиозинов», которые в молекуле расположены в линейной последова-

тельности (Лауффер и Эндрью Сент-Дьердьи). Если значение молекулярного веса миозина, полученное Лаки и Кароллем, правильно, то молекула миозина содержит три частицы меромиозинов; если же правильно веберовское значение молекулярного веса, то она содержит шесть таких частиц. Если предположить, что правильно меньшее значение, то молекула миозина будет выглядеть так, как это изображено на рис. 1. Из двух видов меромиозинов один несколько толще и быстрее осаждается при центрифугировании — он назван Н-меромиозином (Н — от слова «heavy», тяжелый). На рис. 1 он произвольно помещен в середину. Второй же, более тонкий, назван L-меромиозином (L означает «light», легкий); он имеет более низкую константу седиментации. На каждую Н-частицу приходится по две L-частицы.

Трудность согласования этого открытия с прежними концепциями заключается в том, что только Н-меромиозин взаимодействует с АТФ, высвобождая энергию его $\sim P$, тогда как имеются все основания предполагать, что участвуют в сокращении, выполняют работу и используют энергию L-частицы. Энергия как-то переходит от Н-частиц к L-частицам, и трудно себе представить, каким образом могла бы совершать этот переход связанная энергия. Все же остается еще некоторая возможность привести это построение в соответствие с нашей прежней концепцией. Можно предположить, например, что АТФ производит некоторое локальное изменение в Н-частице, а это, в свою очередь, приводит к укладыванию L-частиц на Н-частицы, создавая таким образом укорочение или сокращение. Следовательно, выход все же имеется, хотя и не особенно удачный.

Если теория правильна, то всякое новое открытие должно подтверждать ее и содействовать ее прояснению, как это имело место при изучении промежуточного метаболизма.

Рис. 1. Схематическое изображение молекулы миозина, состоящей из одного Н-меромиозина и двух L-меромиозинов. Порядок расположения меромиозинов выбран произвольно.

В случае миозина дело обстоит совершенно иначе. Эндрью Сент-Дьердьи и Борбиро показали, что и меромиозины также построены из более мелких подъединиц — *протомиозинов*, имеющих одинаковые размеры и относительно небольших. Их молекулярный вес порядка 4500 г; это означает, что каждая частица меромиозина построена из большого числа

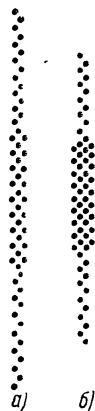


Рис. 2. а) Схематическое изображение молекулы миозина, изображенной на рис. 1, построенной из протомиозинов; б) возможная перегруппировка протомиозинов при сокращении.

протомиозинов: L-частица содержит около 20 протомиозинов, а H-частица — около 50. Эти протомиозины связаны между собой только вторичными силами, как ван-дер-ваальсовские, электростатические и H-связи. Если мы будем называть молекулой атомную структуру, которая удерживается как таковая ковалентными связями, то частицы миозина окажутся не молекулами, а всего лишь агрегатами. Такого рода структура изображена весьма грубым образом на рис. 2,а. Трудно представить себе, каким образом могла бы складываться такая структура; более вероятно, что сокращение является не складыванием, а такой перегруппировкой протомиозинов внутри частицы, которая придает ей более округлую, укороченную форму, как это изображено на рис. 2,б. Для того чтобы такая перегруппировка произошла, должно быть возмущено большое количество слабых сил, удерживающих вместе протомиозины. Невозможно представить себе, каким образом энергия связи, заклю-

ченная в $\sim P$, приводит к таким изменениям, особенно если $\sim P$ находится где-то далеко, на H-меромиозине.

Таким образом, мы можем подытожить ситуацию, сказав, что мы не знаем, как сокращается мышца, как она использует энергию связи для производства работы, и что чем больше мы знаем об ее структуре, тем меньше мы понимаем, как она действует. Здесь мы приблизились к краю пропасти, которая, по-видимому, простирается через всю медицину и биологию и которая, возможно, и ответственна за их «*chiaroscuro*».

2. ТЕОРИЯ ПЕРЕДАЧИ ЭНЕРГИИ

Неоднократно случается, что бессознательно над нашим мышлением довлеют определенные картины, которые мы встречаем слишком часто, чтобы усомниться в их правильности. Мне кажется, что наши затруднения в разрешении проблемы трансформации энергии в мышцах вызваны формализмом нашей термодинамической бухгалтерии, вводящей нас в заблуждение. Когда мы подводим энергетический баланс реакции, мы обычно выражаем в калориях как «потенциальную энергию» связи, так и кинетические формы энергии и тем самым невольно признаем их идентичность. Но между ними есть огромная разница, по крайней мере в их биологической активности. Это можно проиллюстрировать, сравнив ее с разницей между сидением на атомной бомбе, когда ее потенциал остается всего лишь потенциалом, ее связи — связями, а ее энергия заключена внутри атомов, и попыткой усидеть на ней, когда эти связи меняют свою потенциальную форму энергии на более активную кинетическую форму. Хотя механика и может считать, что обе формы энергии по существу идентичны, мы все же почувствуем весьма большую разницу в их биологической активности. Положение с «энергией» $\sim P$ аналогично положению с атомной бомбой. Пока эта энергия заключена в связях молекулы, как потенциал, можно ожидать, что она не будет проявлять какого-либо внешнего действия (разве лишь скажется в увеличении веса молекулы, которое мы заметили бы, имея более чувствительные весы). Эта связанная энергия, как таковая, может быть перемещена от молекулы к молекуле и от связи к связи в реакциях группового переноса, характерных для нашего промежуточного метаболизма. Но для того, чтобы этот потенциал мог включиться в биологическое действие, мог произвести работу или движение, он должен, как и в случае с атомной бомбой, быть заменен на некоторую более активную и мобильную форму энергии. Такой активной и мобильной формой энергии на молекулярном уровне вряд ли может быть что-либо иное, кроме тех или иных форм молекулярного возбуждения — электронного, вибрационного или ротационного. Таким образом, мы, биологи, можем, не опасаясь противоречия со статистической механикой, применить различные

символы для обозначения энергии связи, которая связана с молекулами и не производит внешнего действия, и для энергии возбуждения, которая мобильна и может взаимодействовать с окружающей средой. Первый вид энергии я обозначаю через (E) , подразумевая под E энергию и символизируя скобками, что эта энергия заключена внутри молекулы. Энергию возбуждения я обозначаю через E^* . Итак, я сформулирую нашу проблему следующим образом: не происходит ли в мышце переход энергии связи $\sim P$ в молекуле АТФ из формы (E) в форму E^* и не является ли он необходимым условием для того, чтобы эта энергия могла произвести биологическое действие и вызвать сокращение мышцы? Реакции группового переноса в промежуточном метаболизме могут быть символически записаны в виде:

$$(E_n) \rightleftharpoons \dots \rightleftharpoons (E_3) \rightleftharpoons (E_2) \rightleftharpoons (E_1),$$

где (E_n) означает энергию пищевых резервов, например жиров и углеводов, тогда как (E_1) означает энергию вещества, которое непосредственно питает мышечную машину, в нашем случае АТФ. В этом ряду реакций потенциальная энергия передается от связи к связи, от вещества к веществу. Реакция создания связи связью может быть выражена в символах классической химии. Возникает вопрос: не обусловлено ли наше непонимание работы мышцы тем, что то, что происходит в дальнейшем, т. е. превращение (E) в E^* , относится к группе реакций, которые не могут быть описаны этими символами? Этот дуализм может обнаружиться во всех реакциях, в которых производится некоторая работа ω , будь то механическая, осмотическая, электрическая или какая-либо другая. Тогда как (E) может быть ядром реакций, в которых синтезируются вещества и *строится* машина жизни, E^* может быть ядром реакций, в которых эта машина *приводится в движение* и производит работу. Это могло бы объяснить, почему наши представления, почерпнутые из явлений промежуточного метаболизма, не приводят нас к лучшему пониманию процесса сокращения мышцы.

Допуская трансформацию (E) в E^* , мы не погрязаем в болоте догадок, так как реакция, на которой построена вся жизнь, по существу *является* именно такой трансформацией. Этой реакцией является фотосинтез, который вводит солнечную энергию в живой мир, чтобы приводить его

в движение. В этой реакции радиация улавливается пигментами, в основном хлорофиллом, в котором она производит электронное возбуждение. В дальнейшем эта E^* закрепляется в форме (E) . Впоследствии (E) перемещается от одной связи или молекулы к другой, пока в конце концов не откладывается в форме (E) углеводов или жиров. Таким образом, процесс фотосинтеза может быть символически изображен так:

$$h\nu \rightarrow E^* \rightarrow (E_1) \rightarrow (E_2) \rightarrow (E_3) \rightarrow \dots \rightarrow (E_n).$$

Обратный процесс происходит при хемилюминесценции, когда, например, светячок излучает свет:

$$(E_n) \rightarrow \dots \rightarrow (E_3) \rightarrow (E_2) \rightarrow (E_1) \rightarrow E^* \rightarrow h\nu.$$

Рассматривая этот ряд реакций, нельзя не заметить его тождественности с цепью реакций фотосинтеза. Лишь порядок реакций в этих случаях обратный. Если мы будем рассматривать испускание света светячком только как частный случай создания работы ω , то мы придем к заключению, что энергетика живого мира состоит по существу только из двух процессов: фотосинтеза и обратного ему процесса.

В мышце той E_1 , которой непосредственно питается сокращающийся механизм, является (E) в АТФ; в то же время недавняя работа Арнона с сотрудниками показывает, что АТФ играет весьма важную роль в начальных стадиях фотосинтеза, тогда как Стрелер и Арнольд, а также Арнольд и Давидсон показали, что фотосинтез обратим *).

В вышеприведенных реакциях процессы $(E_n) \rightarrow (E_1)$ представляют реакции так называемого «промежуточного метаболизма». Проблема, подлежащая решению в этой книге,

*) Автор имеет здесь в виду работы, в которых было обнаружено длительное послесвечение освещенных растительных клеток и изолированных хлоропластов, спектр которого совпадает со спектром флуоресценции хлорофилла. В свете новых работ представляется, однако, более вероятным, что мы имеем здесь дело не с хемилюминесценцией, при которой возбужденные молекулы возникают при обращении реакций фотосинтеза, а с рекомбинационным свечением (фосфоресценцией), возникающим при освобождении и рекомбинации электронов, захваченных на «ловушках». См., например, Арнольд и Мик (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 43, 106, 1957), Толлин и Кэлвин (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 43, 895, 1957), Толлин, Сого и Кэлвин (J. de chimie physique 55, 919, 1958), Браггер и Франк (Arch. of Biochem. a. Biophys. 75, 465, 1958). (Прим. ред.)

состоит в следующем: представляет ли $(E_1) \rightarrow E^* \rightarrow w$ реакцию, приводящую в движение жизненную машину, и, относясь к области квантовой механики, может ли она быть выражена только лишь в ее понятиях?

На такой вопрос не может дать ответа какой-нибудь один отдельный эксперимент. Только накопление данных из различных областей может сделать такую теорию приемлемой. Если эта теория окажется правильной, то она должна привести нас к лучшему пониманию различных биологических структур и явлений, должна открыть нам новые горизонты и подсказать новые эксперименты.

3. МОБИЛЬНОСТЬ E^* И ОРГАНИЗАЦИЯ

Никакая форма энергии не может быть мобильна, если нет чего-либо, что могло бы передавать ее. Поэтому, если мы хотим найти те мобильные формы энергии, которые могут принимать участие в процессах биологической передачи энергии, то мы должны рассматривать не только самое энергию, но и механизмы, при помощи которых она может передаваться. В этой главе я рассмотрю условия мобильности энергии и требования, предъявляемые ими к среде, оставляя открытым вопрос о том, какие из этих механизмов фактически играют роль в живых системах. Существование такой передачи видно на примере фотосинтеза, в котором большое количество молекул хлорофилла принимает участие в восстановлении одной молекулы CO_2 (Арнольд и Мик *).

Сопряженные системы, π -электроны и n, π -переходы

Если молекула содержит систему сопряженных двойных связей, то она имеет также π -электроны, которые уже не связаны с одним каким-либо атомом, а принадлежат со-

*) Данные Арнольда и Мик, на которые ссылается автор, являются далеко не единственным и даже, пожалуй, не самым убедительным доказательством миграции энергии в хлоропластах растений и других биологических системах. См. Е. Рабинович, Фотосинтез, т. III, стр. 89—127, ИЛ, 1959, а также обзоры: А. Н. Теренин и В. Л. Ермолеев, Успехи физ. наук 44, 347, 1951 и 58, 37, 1956; Trans. Far. Soc. 52, 1042, 1956; J. de chimie physique, 699, 1958; Ю. А. Владимиров и С. В. Конев, Биофизика 1, 222, 1957. (Прим. ред.)

пряженной системе как целой, внутри которой они имеют большую или меньшую подвижность. Когда такой π -электрон поглощает энергию и возбуждается на более высокий энергетический уровень π^* , то его энергия E^* будет принадлежать всей сопряженной системе и сможет произвести изменения в любой ее точке. Такую обширную сопряженную систему имеет пурин в АТФ, а также пиримидины, изоциклические ароматические соединения или каротины с их длинными цепями, построенными из изопреновых единиц.

Биологические катализаторы и кофакторы часто содержат атомы N, O и S, входящие в их сопряженные системы или связанные с ними. Эти атомы обладают своими «несвязанными», «уединенными» парами электронов, которые могут быть возбуждены на π^* -уровни и тем самым пополняют фонд π^* -электронов *). Эти так называемые n, π^* -переходы, обнаруженные Мак-Мурри и Мулликеном, имеют специфические свойства: время жизни возбужденных состояний значительно больше, чем для π, π^* -переходов, а абсорбция смещается при возрастании электрополярности растворителя в коротковолновую сторону, причем флуоресценция тушится сильными кислотами. Гетерополярный растворитель с его H-связями увеличивает энергию диссоциации этих электронов, которые полностью связываются протонами сильной кислоты (Каша, 1950).

Связанные осцилляторы

Если связать две системы, способные к одинаковым колебаниям, то они составят «связанный осциллятор» и колебания будут передаваться от одной системы к другой и обратно. Если, например, мы подвесим на одну проволоку два маятника с одинаковыми периодами колебания и приведем в колебание один из них, то он вскоре остановится, тогда как другой придет в колебательное движение; через некоторое время второй маятник возвратит движение вместе с его энергией обратно первому маятнику и т. д.

*) Прекрасное изложение физической стороны вопроса о возбужденных электронных состояниях и, в частности, о роли n, π -переходов можно найти в книге: С. Рид, Возбужденные электронные состояния в химии и биологии, ИЛ, 1960. (Прим. ред.)

Если A и B — два связанных маятника, а состояние колебания обозначить звездочкой (*), то

$$A^* + B \rightarrow A + B^* \rightarrow A^* + B \rightarrow A + B^* \text{ и т. д.}$$

Суть этого простого опыта в том, что энергия, сообщенная одному из двух осцилляторов, не делится между ними и тем самым не деградирует до очень малых значений, а периодически полностью переходит от одного маятника к другому. Если бы не было трения и эта передача энергии совершалась без потерь, то такая периодическая передача энергии происходила бы до бесконечности.

Различные атомные группы белка способны колебаться, вибрировать и вращаться подобно маятнику. Если две такие группы с одинаковыми частотами колебания связаны, допустим, полипептидной цепью, то они могут действовать как связанные осцилляторы. Вполне возможно, что все такие группы внутри одной и той же молекулы белка действуют как связанные осцилляторы, и таким образом вибрационная энергия, сообщенная одной из них, может быть потреблена любой другой. Вся молекула белка составляет одну единую систему, и энергия, сообщенная ей, будет принадлежать всей системе в целом и сможет проявиться в любой ее точке.

Э л е к т р о м а г н и т н а я с в я з ь

Электронное возбуждение также может рассматриваться как своего рода колебание. Поэтому две молекулы, электроны которых могут одинаковым образом возбуждаться, способны вести себя как связанные осцилляторы. В этом случае нет необходимости в наличии материальной связи между ними, так как их связывает электромагнитное поле, если только расстояние между ними не слишком велико (мало по сравнению с соответствующей длиной волны).

Передача энергии возбуждения от одной молекулы к другой посредством электромагнитной связи не является просто лишь предположением. На ней основана одна из основных теорий, объясняющих классическое явление «концентрационной деполаризации» флуоресценции. Было найдено, что если разведенный (например, до концентрации 10^{-4} М) раствор флуоресцирующего вещества охладить до

низкой температуры, так, чтобы образовалось твердое стекло, в котором каждая молекула имеет фиксированную ориентацию, то, как правило, свет флуоресценции, излучаемый этой системой, будет поляризован, если возбуждение производилось поляризованным светом *). Фиксированные в пространстве молекулы не могут изменить плоскости поляризации за время между поглощением и эмиссией фотона. Если, однако, этот эксперимент повторить при высокой концентрации флуоресцирующего вещества (например, 10^{-4} М), то свет флуоресценции окажется неполяризованным. Общепринятое объяснение этого таково: при высокой концентрации молекулы уже находятся очень близко друг к другу, и так как они связаны электромагнитным полем, то E^* передается от одной к другой прежде, чем она покинет поглотившую свет молекулу в виде испущенного фотона. Различные молекулы, к которым переходит E^* , имеют случайную ориентацию, и потому теряется определенная связь между плоскостью поляризации первичного возбуждающего света и плоскостью поляризации света флуоресценции, а вместе с тем теряется и поляризация света флуоресценции. Это происходит тогда, когда среднее статистическое расстояние между растворенными молекулами меньше того расстояния, при котором возможен та-

*) Поляризацию флуоресценции и явление концентрационной деполаризации можно наблюдать и при комнатной температуре в растворах достаточно высокой вязкости, например в глицерине. Возбуждение поляризованным светом не является необходимым условием, так как при достаточно высокой вязкости или достаточно низкой температуре свет флуоресценции будет частично поляризован и при возбуждении естественным светом (за исключением случая, когда наблюдение производится в направлении возбуждающего света). Правда, степень поляризации при возбуждении естественным светом при прочих равных условиях меньше, чем при возбуждении светом поляризованным. Параллельно с концентрационной деполаризацией идет и процесс «концентрационного тушения». Оба эти явления были детально исследованы С. И. Вавиловым, Ф. Перреном и рядом других исследователей. Теория концентрационной деполаризации и концентрационного тушения, основанная на представлении о резонансной или индукционной передаче энергии от одной молекулы растворенного вещества к другой, была впервые разработана и обоснована С. И. Вавиловым. См. С. И. Вавилов, Собрание сочинений, т. 1 и 2, Изд-во АН СССР, 1952 и 1954. О поляризации люминесценции см. книгу П. П. Феофилов «Поляризованная люминесценция атомов, молекул и кристаллов», Физматгиз, 1959. (Прим. ред.)

кой резонансный перенос возбуждения. На рис. 3 изображена зависимость среднего статистического расстояния

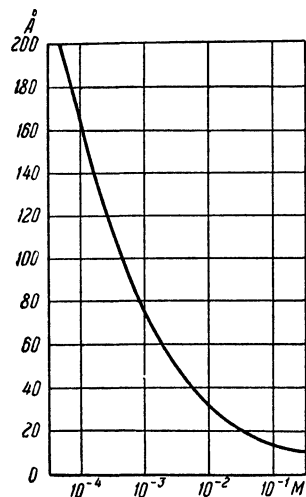


Рис. 3. Соотношение между средним статистическим расстоянием между молекулами и молярной концентрацией растворенного вещества. Если в растворе имеются два различных вещества, то среднее расстояние между их молекулами равно примерно 70% значения, указанного на графике.

между молекулами от молярной концентрации растворенного вещества. Определяя ту концентрацию, при которой исчезает поляризация флуоресценции, мы можем, следовательно, найти расстояние, на котором становится возможным электромагнитное взаимодействие молекул. Это критическое расстояние может даже превзойти 100 Å, что соответствует концентрации порядка 10^{-3} М. Диаметр многих макромолекул такого же порядка, так что E^* может мигрировать между атомными группами одной и той же макромолекулы или соседних макромолекул в результате их электромагнитной связи. Необходимо специально отметить одну особенность этого механизма миграции энергии: в нем не участвуют фотоны. Дело не происходит так, будто первая молекула, поглотив свет, вновь излучает фотон, который затем поглощается второй молекулой *).

Процесс происходит без участия фотонов и обусловлен прямой электродинамической связью между обеими молекулами.

Перенос E^* в результате электродинамической связи происходит не только между одинаковыми молекулами, но также и между молекулами различных веществ. Особенно

*) Процесс так называемой вторичной флуоресценции, обусловленный поглощением одной молекулой света флуоресценции, испущенного другой молекулой, также существует, но он совершенно отличен от рассматриваемого здесь автором процесса резонансной (или индукционной) миграции энергии возбуждения. (Прим. ред.)

благоприятно для такого переноса значительное перекрытие спектра флуоресценции молекулы A со спектром абсорбции молекулы B , получающей E^* . Кроме этой «площади перекрытия», вероятность процесса зависит от длительности возбужденного состояния молекулы A^* и длины волны. От этих факторов зависит, следовательно, и расстояние, на котором может произойти такая передача энергии.

Действительно, было показано, что в биологических системах такой перенос энергии существует. Арнольд и Оппенгеймер показали, что энергия света, поглощенного в зеленой водоросли пигментом фикоцианином, переносится с большой эффективностью к хлорофиллу с помощью такого механизма с электродинамической связью. Хлорофилл в свою очередь передает энергию последующим звеньям фотосинтетического аппарата, которые с ее помощью строят углеводы, преобразуя E^* в (E) . Дьюйзенс обнаружил аналогичный перенос энергии от каротеноидов к хлорофиллу b в синих и красных водорослях и от хлорофилла b к хлорофиллу a в зеленой водоросли *хлорелла*.

Энергетические полосы. «Теория непрерывности»

Если физическая система имеет высокую степень регулярности в расположении ее атомов, как это имеет место в кристаллах, а возможно, и в белках, то атомы возмущают орбиты друг друга и энергетические уровни их сливаются в общие, практически непрерывные дискретные полосы, или «зоны», энергии. Если такая полоса заполнена, т. е. содержит максимально возможное число электронов ($2n$, если n — число атомов), то энергия не будет переноситься этими электронами. Если, однако, полоса не заполнена, то ее электроны могут быть ускорены в определенном направлении и способны переносить энергию. Именно таким образом металл проводит электричество.

Если вещество имеет полностью заполненные полосы, а выше расположенные полосы пустые, то оно будет изолятором, или диэлектриком. Однако если расстояние между высшей заполненной полосой и низшей незаполненной не очень велико, то электроны могут быть переведены из

низшей зоны в высшую, что делает вещество проводящим. Если расстояние между двумя зонами мало, то даже теплового возбуждения может быть достаточно, чтобы произвести это изменение. В этом случае вещество является «полупроводником». Поглощенные веществом фотоны также могут создать в нем «фотопроводимость». Еще ранее (1946, 1947) я указывал, что белки, возможно, имеют электронную структуру, аналогичную электронной структуре полупроводников. Ивэнс и Гергели показали, что водородные связи в белковой молекуле могут создать условия, которые приведут к возникновению таких непрерывных энергетических полос, хотя результаты этих авторов еще не являются окончательными. Расстояние между верхним краем заполненной зоны и нижним краем незаполненной зоны было получено в расчетах слишком большим; для перевода электрона из низшей зоны в верхнюю необходима была бы энергия порядка 100 000 кал/моль.

Имеются и экспериментальные доказательства полупроводниковой природы биологических веществ. Элей, Парфитт, Перри и Тайсум обнаружили полупроводниковые свойства у альбумина плазмы, фибриногена и эдестина. Расстояние между высшей заполненной и низшей незаполненной зонами оказалось несколько меньше подсчитанного Ивэнсом и Гергели, причем было установлено, что вода снижает значение энергии, необходимой для переброса электронов через этот промежуток.

В. Арнольд недавно показал, что хлоропласты могут «накапливать свет», т. е. консервировать энергию поглощенных фотонов, которую они затем, при нагревании, вновь излучают в виде света. Вряд ли это можно объяснить иным образом, кроме допущения существования энергетических зон. Электроны, поднятые в верхнюю зону, застревают в «ловушках» или на «уровнях захвата», т. е. как бы оказываются в «яме», из которой они могут быть выброшены тепловым возбуждением. Значение разности энергии между зонами оказалось еще меньше, чем это было найдено Элеем и др., что делает энергию, необходимую для перевода электрона в незаполненную верхнюю зону, лежащей в области биологических возможностей.

Зоны проводимости не обязательно кончаются на границе белковой молекулы. Если контакт между двумя моле-

кулами достаточно тесен, то их зоны могут слиться, соединяя таким образом отдельные молекулы белка в общую систему.

Миграция энергии по белковой молекуле представляет экспериментальный факт. Первый пример такой миграции был дан в опытах Бюхера и Касперса, которые нашли, что свет, поглощенный белком в миоглобине, вызывает диссоциацию СО, связанной с гемом. Энергия фотона, поглощенная белком, перемещается сначала по молекуле белка, а затем по гему, чтобы достичь СО. Если что-либо и ограничивает ценность этого результата, то это лишь то, что энергия может мигрировать по белку в виде акустической волны, а не в виде электронного возбуждения. Эта возможность, однако, исключается результатами исследований Баннистера, который показал, что свет, поглощенный белком фикоцианина, излучается как свет флуоресценции хромофором этого хромопротеина. Так же убедительны и эксперименты Шора и Парди, которые присоединяли флуоресцирующие красители к протеинам и нашли, что фотоны, поглощенные белком, возбуждают флуоресценцию этих красителей, и притом в некоторых случаях почти со 100 % эффективностью. Эти авторы оставляют открытым вопрос о механизме переноса энергии, но склоняются к объяснению его наличием резонансной связи между поглощающей свет ароматической аминокислотой белка и флуоресцирующим красителем. В таком случае перенос энергии осуществляется не по белку, а через электромагнитное поле.

Как было сказано в начале этой главы, я оставляю открытым вопрос о том, какой из этих механизмов миграции энергии играет роль в биологии и играет ли вообще роль какой-нибудь из них. Возможности здесь разнообразны. Так, например, стопки гетероциклических пуриновых и пиримидиновых оснований, которые, согласно модели Ватсона и Крика, образуют основу ДНК (и, возможно, РНК)*) могут создавать условия для миграции энергии благодаря электростатической связи аналогично тому, как это имеет место в красителях Шайбе, молекулы которых образуют стопку и проводят E^* . Ранее (1955) мной было найдено,

*) По вопросу о строении ДНК и РНК в связи с их ролью в хранении основной генетической информации см. сборник статей «Нуклеиновые кислоты» под редакцией Чаргаффа и Дэвидсона, ИЛ, 1957.

что некоторые белки имеют более сильную флуоресценцию, чем можно было бы ожидать при аддитивном сложении флуоресценции составляющих их частей. Это указывает на то, что E^* молекулы определяется ее структурой в целом. Такие механизмы проведения энергии могут, возможно, объяснить также диспропорцию между количеством лекарств или гормонов и массой системы, на которую они действуют. Подобно тому как сложная система электрических проводов может быть выведена из строя повреждением изоляции или установлением проводимости в одной точке, так и биологическая система энергетических проводников может быть выведена из строя, если нарушить ее в одной точке, как это имеет место в изучавшихся Шайбе стопках молекул красителей, в которых миграция энергии может быть нарушена одной молекулой гидрохинона.

4. АБСОРБЦИЯ, ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ И ФОСФОРЕСЦЕНЦИЯ *)

Молекулы дают нам сведения о себе посредством фотонов, которые они поглощают или излучают. Этот параграф посвящен оценке и расшифровке некоторых из этих сведений в связи с проблемой биологического переноса энергии.

Если фотон, сталкивающийся с молекулой, не встретит электрона, который смог бы поглотить его энергию, то он проходит через эту молекулу, не оставляя за собой никаких возмущений. Если же он встретится с таким электроном, то этот электрон поглотит фотон и возбудится до более высокого энергетического уровня. Для того чтобы вещество могло передавать E^* , оно должно быть способно воспри-

*) Интересующиеся флуоресценцией и связанными с ней явлениями могут воспользоваться двумя прекрасными монографиями, написанными в этой области Форстером и Прингсгеймом. Современные представления о триплетном состоянии были недавно собраны в обзоре Каша и Мак-Глинна. [На русском языке, кроме перевода книги Прингсгейма «Флуоресценция и фосфоресценция» (ИЛ, 1951), можно указать монографии В. Л. Левшина «Фотолюминесценция жидких и твердых тел» (Гостехиздат, 1951), Б. И. Степанова «Люминесценция сложных молекул» (Изд-во АН БССР, 1956) и Э. И. Адировича «Некоторые вопросы теории люминесценции» (Гостехиздат, 1957). (Прим. ред.)]

нять ее. Поглощение света дает нам сведения о том, какую энергию молекула способна воспринять.

Дальнейшая судьба E^* , сообщенной молекуле *in vitro*, зависит от свойств возбужденного электрона и молекулы, в которую он входит. Электроны внешних оболочек молекул обычно принадлежат одному индивидуальному атому и связаны с его ядром. Когда такой связанный электрон возбуждается, то он легко вызывает колебания ядра возле равновесного положения и растрчивает свою E^* , которая в конечном счете диссипируется в тепло. Очевидно, такой электрон не может служить передатчиком энергии.

Молекулы, содержащие сопряженные двойные связи, имеют несвязанные электроны, которые принадлежат не отдельным атомам, а всей сопряженной системе в целом. Эти π -электроны, как правило, возбуждаются легче, чем связанные. Не будучи сильно связанными с каким-либо определенным ядром, они менее склонны также и вызывать колебания ядер. Однако если молекула содержит слабые связи, которые могут быть разорваны или нарушены за счет E^* , когда эта энергия превосходит энергию диссоциации, то E^* , сообщенная молекуле, будет использована для разрыва или нарушения этих связей. Такие молекулы, очевидно, также не могут служить передатчиками E^* . Если же у молекулы нет таких слабых мест и она не способна диссипировать энергию своего возбуждения (и если, кроме того, не происходит дезактивация при столкновениях), то эта молекула должна будет испустить свою E^* в виде фотона, так как молекула может хранить E^* лишь очень короткое время, порядка 10^{-8} — 10^{-9} сек. Это означает, что молекула будет флуоресцировать. Наличие флуоресценции, таким образом, говорит о том, что молекула способна воспринимать энергию и не диссипирует ее. Для того чтобы какая-нибудь молекула могла служить передатчиком энергии, она должна обладать этими двумя свойствами. В силу этого флуоресценция становится в нашем исследовании наиболее важным индикатором, хотя сама по себе она может и не иметь прямого биологического значения, так как свет флуоресценции ничем не отличается от иного света. В действительности биологическая роль этих молекул заключается не в излучении, а в передаче энергии, так что в своих естественных условиях они могут вообще не флуоресцировать

или флуоресцировать очень слабо (излучается лишь небольшая часть энергии). Например, хлорофилл, наиболее важный передатчик энергии в растении, обладает очень слабой флуоресценцией; в экстракте же его флуоресценция очень ярка *).

Конечно, способность экстракта ткани флуоресцировать не обязательно означает наличие в ней передатчика энергии, так же как отсутствие флуоресценции не обязательно исключает его. Флуоресценция может быть подавлена другими веществами, которые поглощают свет или воздействуют на возбужденные состояния. Флуоресценция может отсутствовать также и потому, что молекула приобретает определенную структуру, являющуюся необходимым условием для флуоресценции, лишь в связи с другими имеющимися в клетке веществами, например металлами или белками.

Органические молекулы, флуоресцирующие в растворе, могут принадлежать к различным группам, но можно ожидать, что все они обладают системой сопряженных двойных связей. Одну из основных групп составляют ароматические углеводороды, которые не имеют заряда и не могут присоединять или отдавать протоны. В соответствии с этим их флуоресценция не зависит от pH и окислительно-восстановительного потенциала. Область их абсорбции находится в основном в ультрафиолете.

Другую важную группу флуоресцирующих веществ составляют молекулы, имеющие заряды, колебания которых принимают участие в возбуждении. Флуоресценция этих молекул чувствительна к pH и окислительно-восстанови-

*) По современным данным квантовый выход флуоресценции хлорофилла *in vitro* равен 25—30%, тогда как *in vivo* (в листьях высших растений, одноклеточных водорослях и изолированных хлоропластах) он не превышает 2—3%. Очень существенно, что при этом не строго пропорционально, но параллельно сокращается и длительность возбужденного состояния хлорофилла, имеющая *in vitro* значение $8 \cdot 10^{-9}$ сек., а *in vivo* — $(0,8—1,0) \cdot 10^{-9}$ сек. Это указывает на то, что причиной уменьшения выхода флуоресценции хлорофилла *in vivo* является, по крайней мере в основном, происходящая во все время пребывания молекулы хлорофилла в возбужденном состоянии конкуренция между обычными (имеющими место *in vitro*) процессами дезактивации возбужденной молекулы и тем специфичным для клетки процессом, который приводит к использованию этой энергии для фотосинтеза. (Прим. ред.)

тельному потенциалу; их абсорбция находится в основном в более длинноволновом участке, в видимой части спектра. К этой группе относятся красители. Одним из классических представителей этой группы является краситель родамин В (рис. 4), заряд которого осциллирует между двумя его азотами. Родамин имеет одну полосу абсорбции в ультрафиолете и другую в видимой области с максимумом при 554 мμ.

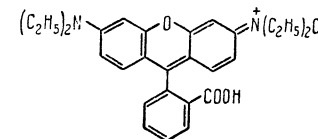


Рис. 4. Родамин В.

При облучении ультрафиолетовыми лучами он поглощает их, но, согласно законам спектроскопии, испускает свет своей флуоресценции с низшего абсорбционного уровня. Это симво-

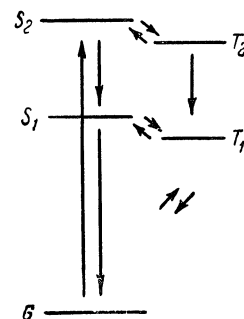


Рис. 5. Схема электронных возбужденных уровней: G — основное состояние, S_1 — нижний синглетный возбужденный уровень, S_2 — следующий высший синглетный уровень, T_1 — нижний триплетный уровень, T_2 — следующий высший триплетный уровень. Колебательные уровни опущены. Короткими стрелками отмечены запрещенные переходы.

лически изображено на рис. 5, где линия G обозначает нормальное, или основное, состояние молекулы. Стрелка $G \rightarrow S_2$ обозначает возбуждение молекулы ультрафиолетовым светом. Стрелка $S_2 \rightarrow S_1$ обозначает «внутреннюю конверсию», при которой электрон отдает в безфотонном процессе свой излишек энергии и падает на энергетический уровень своей нижней абсорбционной полосы; излишек же энергии рассеивается в виде тепла. Стрелка $S_1 \rightarrow G$ обозначает излучение энергии в виде оранжевого света флуоресценции, в результате чего электрон падает обратно на основной уровень, присоединяясь к своему парному электрону. Известно, что электроны, как правило, занимают орбиты попарно и в каждой паре имеют

противоположно направленные спины. Правила отбора квантовой механики разрешают не более чем двум электронам занимать один энергетический уровень, да и то лишь в том случае, если они обладают противоположно

направленными спинами; в этом случае эти два «спаренные» спина нейтрализуют внешнее электромагнитное действие друг друга, делая молекулу диамагнитной.

Флуоресценцию различных веществ, например родамина, удобнее всего наблюдать в темноте, освещая раствор ртутной лампой высокого давления, снабженной светофильтром, пропускающим лишь излучение ближней ультрафиолетовой области спектра. Эти лучи возбуждают краситель, но не мешают наблюдению, так как они невидимы для глаза. Мои наблюдения, описанные в этой книге, сделаны именно при таком освещении. Максимум спектральной полосы флуоресценции несколько смещен в сторону больших длин волн по сравнению с максимумом абсорбции, так как некоторая доля энергии кванта теряется по пути. Поэтому, например, максимум абсорбции родамина лежит около 554 мμ, а максимум его флуоресценции — около 578 мμ.

Такого рода возбуждение, при котором электрон просто поднимается на высший энергетический уровень, а затем падает обратно, называется «синглетным возбуждением» в соответствии с тем, что в спектре оно порождает лишь одну линию *). Однако всегда имеется хотя и малая, но конечная вероятность, что при возбуждении электрона изменится знак его спина, так что спин его станет параллельным спину прежнего партнера. Состояние, соответствующее такому повороту спина, называется «триплетным состоянием», так как соответствующая синглетная спектральная линия может расщепиться на три линии (триплет). Вероятность такого процесса мала, так как правила отбора квантовой механики запрещают электронные переходы между уровнями различной мультиплетности, например переход с синглетного уровня на триплетный и обратно. «Запрет» означает малую вероятность.

*) На протяжении всей книги автор часто пользуется терминами «синглетное (или триплетное) возбуждение». Следует иметь в виду, что мультиплетность характеризует определенное энергетическое состояние (терм) молекулы или атома, а не механизм его возбуждения. Поэтому слова «синглетное (триплетное) возбуждение» следует понимать как «возбуждение в синглетное (триплетное) состояние». Равным образом слово «триплет», которым также широко пользуется автор, нужно понимать как «триплетные состояния» или «молекулы, находящиеся в триплетном возбужденном состоянии». (Прим. ред.)

Но если такой переход в триплетное состояние произойдет и спин возбужденного электрона изменит свое направление на противоположное, то электрон не сможет упасть назад на свой исходный уровень, чтобы присоединиться к своему партнеру, спин которого теперь имеет такое же направление. В силу этого возбужденный электрон захватывается на возбужденном триплетном уровне, который, как правило, имеет меньшую энергию, чем соответствующий синглетный уровень, так как часть энергии теряется в ходе процесса. Если разность значений энергии между этими двумя уровнями мала, то тепловое возмущение может поднять электрон обратно на синглетный уровень (переход $T_1 \rightarrow S_1$ на рис. 5). Если при этом электрон изменит свой спин, то он может упасть обратно на основной уровень, излучая излишнюю энергию в виде *затяжной флуоресценции*. Большей же частью электрон в триплетном состоянии в конце концов в результате тепловых столкновений растрчивает свой избыток энергии и таким образом исчезает со сцены без излучения света. Вероятность падения электрона с триплетного уровня прямо на синглетный с испусканием фотона очень мала, и поэтому излучение света, соответствующее стрелке $T_1 \rightarrow G$ на рис. 5, — редкое явление. Излучение света, соответствующее прямому триплет-синглетному переходу, т. е. переходу с возбужденного триплетного уровня на основной, после работ Льюиса с сотрудниками называется *фосфоресценцией* в отличие от *флуоресценции*, которая соответствует синглет-синглетным переходам *). Так же редко происходит и обратное — пря-

*) Вводимая здесь автором терминология, основанная на разделении всех процессов люминесценции по признаку ее длительности на явления «флуоресценции» и «фосфоресценции», в настоящее время уже устарела и в значительной мере потеряла физический смысл, хотя она еще и держится в литературе довольно упорно. В предисловии к книге П. П р и н г с г е й м а «Флуоресценция и фосфоресценция» (ИЛ, 1951) С. И. Вавилов пишет по этому поводу следующее: «Старые термины «флуоресценция» и «фосфоресценция», связанные в буквальном значении со свойствами флуорита и фосфора, давно уже приобрели в научном обиходе примерно такой же смысл, как слова «теплый» и «холодный» в учении о теплоте. Флуоресценцией называют свечение, длящееся очень недолго после прекращения возбуждения; наоборот, фосфоресценцией обозначают длительное послесвечение. После того как были реализованы приборы, позволяющие проследить и измерить послесвечение от дробей миллиардных долей секунды до каких угод-

мой переход с основного уровня на возбужденный триплет ($G \rightarrow T_1$ на рис. 5) при абсорбции фотона. Эта абсорбция называется «триплетной абсорбцией».

С переходом электронов на триплетные уровни связаны важные последствия. Во-первых, время жизни возбужденного состояния сильно удлиняется, как правило, примерно в миллион раз (Беккер и Каша). Далее, молекула, содержащая «неспаренные» электроны, становится парамагнитной и будет находиться в несбалансированном, более реактивном состоянии. Во многих отношениях она ведет себя, как свободный радикал.

Если мы хотим изучать электроны в триплетном состоянии, мы должны стабилизировать их, предохранить насколько возможно от дезактивирующих тепловых столкновений. Этого можно достигнуть, заключая их в твердое стекло, например в расплав борной кислоты или в сахарный леденец. В некоторой степени способствует этому и охлаждение, снижающее тепловое возмущение. Комбинируя оба метода, мы можем растворить изучаемое вещество в таком

но больших значений, разумеется, нельзя более говорить о строгом количественном ограничении от фосфоресценции, точно так же как невозможно количественно разделить понятия «теплого» и «холодного». Эти слова удобны и привычны для быстрой качественной характеристики явлений, и в этом оправдание их сохранения в языке.

Взамен этой устарелой и неточной классификации явлений люминесценции С. И. Вавилов предложил, другую классификацию, основанную на различии в механизмах возбуждения свечения (см. примечание С. И. Вавилова к указанной книге Прингсгейма на стр. 16). По Вавилову, следует разделить явления люминесценции на три группы:

1. Излучение, отвечающее так называемым *спонтанным* (не зависящим от внешних условий) процессам возвращения возбужденных частиц с излучением к состоянию с меньшей энергией. Это могут быть процессы электродипольного, магнетодипольного, квадрупольного и т. д. характера, и соответственно длительность их может иметь значения примерно от 10^{-9} сек. до 10^3 сек. К этой группе относятся все те явления, которые в данной книге называются *флуоресценцией*, причем фактически речь идет всегда о дипольном излучении, соответствующем синглет-синглетному переходу и характеризующемуся длительностью порядка $10^{-8} - 10^{-9}$ сек.

2. Излучение, в процессе которого имеет место пребывание в метастабильном состоянии, в которое частица попадает вынужденным путем и из которого она может выйти тоже только вынужденно. Если из метастабильного состояния частица возвращается на нормальный лабильный уровень и излучение связано с переходом с этого

растворителе, как глицерин, а затем заморозить его сильным охлаждением в сухом льду или жидком N_2 до состояния твердого «стекла». Таким способом мы увеличим число электронов на триплетных уровнях. Чем больше электронов будет в этом состоянии, тем больше будет число переходов на основной уровень с испусканием света «фосфоресценции». Для того чтобы убедиться в том, что наблюдаемое свечение есть действительно фосфоресценция, а не флуоресценция, т. е. что свечение происходит при переходах с триплетного уровня, мы можем наблюдать это свечение с помощью флюороскопа. Это прибор, который попеременно отсекает то возбуждающий свет, идущий от источника света к фосфоресцирующему веществу, то свет, идущий от фосфоресцирующего вещества к наблюдателю. Если «темновой промежуток», т. е. интервал времени между прекращением возбуждения и моментом наблюдения, равен, скажем, 10^{-3} сек., то наблюдаемое свечение обусловлено переходами из возбужденного состояния, длительность которого не меньше 10^{-3} сек., т. е. представляет собой фосфоресценцию. Длительность флуоресценции имеет значения порядка

уровня в основное состояние, то спектр свечения совпадает со спектром флуоресценции; если же излучение связано с прямым переходом с метастабильного уровня в основное состояние, то спектр свечения смещен в длинноволновую сторону. Очень удобно свечение первого рода называть, как это предложил Лейс, α -полосой или α -свечением, а свечение второго рода — β -полосой. Излучение этого типа автор и называет *фосфоресценцией* хотя это название очень неудачно. Лучше всего было бы, как мне кажется, ввести для него специальный термин: «метастабильная» или «триплетная флуоресценция» (предложенный Прингсгеймом для α -свечения термин «длительная флуоресценция» Вавиловым с достаточными основаниями забракован; см. книгу Прингсгейма, прим. на стр. 233). Поскольку, однако, этот термин не получил еще широкого распространения, мы сохранили в этой книге обозначение «фосфоресценция», которое при сделанных разъяснениях не может привести к недоразумениям.

3. Излучение, сопровождающее *рекомбинацию* частицы с электроном или ионом после предварительной диссоциации. Простейшим примером такого рода люминесценции служит непрерывный спектр водорода, завершающий сериальные спектры и отвечающий некваंटованным возвращением электрона к иону водорода. Важный случай рекомбинационного свечения — многие явления люминесценции кристаллофосфоров. Мне кажется, что термин «фосфоресценция» было бы целесообразно сохранить только для люминесценции этого типа, упразднив сложный и неуклюжий термин «кристаллофосфоресценция». (Прим. ред.)

10^{-8} сек. В своей работе автор применял два фосфороскопа: один быстрый с «темновым интервалом» в 10^{-3} сек., другой медленный, который пропускал свет лишь от «долгоживущего возбуждения», длившегося 0,1 сек. и более.

Для триплетного состояния характерна еще одна особенность, которая может иметь первостепенное значение в биологии. Она состоит в том, что вероятность синглет-триплетного перехода может быть изменена, т. е. поддается регулирующим воздействиям. Вероятность перехода из синглетного состояния в триплетное может, например, сильно увеличиваться в присутствии парамагнитных молекул, таких, как O_2 , или тяжелых атомов с высоким атомным номером, как йод, ядро которого создает вокруг себя электромагнитное возмущение. Когда возбужденный электрон оказывается в этой области, возникают условия, при которых возможны переходы с переворачиванием спина. Прекрасный пример этого приведен в работе Каша (1952), который показал, что почти чистый синглетный спектр дихлоронафталина переходит в почти чистый триплетный спектр, если заместить хлор более тяжелым йодом. Однако еще важнее то, что нет необходимости вводить йод в молекулу для того, чтобы получить это изменение. Достаточно добавить его к раствору в форме этилйодида. Этот эффект мне кажется особенно интересным потому, что йод содержится в одном из основных регуляторов клеточной энергии — тироксине (и родственных ему соединениях), тогда как O_2 , одна из очень немногих молекул, парамагнитных в их нормальном состоянии, наиболее тесно связана с энергетикой жизни.

Биологическая энергетическая единица, энергия $\sim P$, равна примерно 10 ккал/моль, что соответствует длине волны в 2—3 μ ; иными словами, фотон, соответствующий этой длине волны, имеет ту же энергию, что и $\sim P$, рассчитанная, конечно, на одну молекулу. Волны такой длины лежат в близкой инфракрасной области. Таким образом, это и есть та спектральная область, которая будет представлять наибольший непосредственный интерес для биологов. Она интересна и сама по себе. Именно здесь чисто электронные и вибрационные возбуждения становятся равными по величине и переходы между ними наиболее легки (возможно, именно это и является одной из причин того, что биологи-

ческий квант расположен в этой области). Как и другие пограничные области, эта спектральная область, лежащая за областью видимой спектроскопии и до области обычной инфракрасной спектроскопии, представляет собой еще «ничейную территорию». Эта область полна неожиданностей даже для физиков. Ее секреты охраняются как техническими трудностями (например, отсутствием хороших детекторов), так и водой, которая имеет в ней несколько полос поглощения.

5. ТРИПЛЕТЫ И ВОДА

Изучение возбужденных электронных состояний дает нам ценные сведения о свойствах и реакциях молекул, но принимают ли эти возбужденные состояния участие в биологических реакциях и переносе энергии — это иной вопрос. Есть основания сомневаться в этом. Синглетные возбужденные состояния живут слишком короткое время, для того чтобы было возможно использовать их энергию или управлять ею. Кроме того, чисто электронное возбуждение, соответствующее видимой части спектра, требует квантов энергии, которые, как правило, слишком велики, чтобы быть приемлемыми для биологических систем. Наиболее длинная видимая волна соответствует энергии около 40 ккал/моль, тогда как единица биологической энергии, энергия $\sim P$, имеет порядок величины 10 ккал/моль.

Эти трудности отпадают в случае триплетных состояний, время жизни которых больше, а энергия меньше; энергетические уровни их могут соответствовать даже ближней инфракрасной области. Однако те же запреты, которые привлекают внимание к синглет-триплетным переходам, в то же время как будто делают их и бесполезными для биолога. Маловероятное возбуждение не может иметь значения для клетки. Таким образом, мы остаемся с пустыми руками.

Имеется еще одно затруднение. Биологическим растворителем является вода, а не бура или глицерин, вода же имеет много странных и уникальных свойств, например ярко выраженный дипольный характер. Причины, по которым физики при изучении триплетной люминесценции избегают применять воду в качестве растворителя, очевидны.

При замораживании вода растрескивается, становится неоднородной и малопригодной для оптических измерений. Вода делается неоднородной не только оптически, но и химически, так как она имеет тенденцию выкристаллизовываться и выделять растворенные молекулы. Таким образом, у физиков имелись серьезные основания избегать воды в качестве растворителя. Но биологи неразрывно связаны с ней. Жизнь зародилась в воде, развилась в воде, вода является ее растворителем и средой. Она является «матрицей» (*matrix*) жизни.

Поэтому, прежде чем отбрасывать электронные возбужденные состояния как путь переноса биологической энергии, мы должны изучить воду и повторить некоторые классические эксперименты в этой среде, сколько бы неподходящей она ни была для физических измерений. Если мы не можем устранить эти трудности, то мы можем уменьшить их. Путем быстрого охлаждения наших растворов можно, например, попытаться создать по возможности эвтектический лед, содержащий растворенные вещества. Для этого применяют тонкостенные пробирки малого диаметра, которые быстро погружают в охлаждающую смесь, например в смесь этилен-гликоль-монометил-эфира с сухим льдом.

Мы можем начать наши эксперименты, растворив сначала различные флуоресцирующие красители и другие флуоресцирующие вещества в глицерине, как это делает физики. Рассматривая пробирки с этими растворами под ртутной лампой, снабженной фильтром, пропускающим только ультрафиолетовые лучи, мы можем наблюдать их флуоресценцию. Охлаждение этих пробирок в нашей охлаждающей смеси с сухим льдом не вызовет сильных изменений. Интенсивность флуоресценции несколько увеличится, появится «длительное послесвечение», но цвет, т. е. спектральный состав излученного света, как правило, остается неизменным. Результаты будут те же, если вместо глицерина применить 10%-ный водный раствор глицерина или 2%-ный раствор метанола.

Положение в корне изменится, если мы перейдем к чистой воде как к растворителю. При комнатной температуре мы увидим обычную флуоресценцию, но при замораживании обнаружим, что картина полностью изменяется: свечение исчезнет или изменится по цвету.

Если, например, погрузить в охлаждающую смесь пробирку с водным раствором родамина в концентрации 10^{-4} М, то при освещении ультрафиолетовыми лучами в верхней части пробирки наблюдается хорошо известная ярко оранжевая флуоресценция этого красителя, тогда как нижняя, замерзшая часть почти совсем не излучает света. Ниже будет приведено достаточно доказательств того, что эти изменения обусловлены не тем, что молекулы красителя перестают возбуждаться, и не диссипацией энергии их синглетного возбуждения. Молекулы так же возбудимы, как и раньше, что видно из почти не изменившегося цвета раствора, и не диссипируют энергию (низкая температура и твердое состояние не благоприятствуют такой диссипации). Изменение обусловлено тем, что возбужденные электроны в этих условиях переходят на «запрещенные» триплетные уровни. Определенные условия, существующие в замерзшей воде, делают эти переходы не только разрешенными, но и наиболее вероятными, в результате чего почти все молекулы переходят в триплетное состояние.

Если повторить тот же опыт с замораживанием раствора родамина, но вместе с красителем растворить тиамин гидрохлорид в концентрации 10^{-3} М, то незамерзший раствор в верхней части будет обладать той же оранжевой флуоресценцией, что и раньше, но в замерзшей части теперь наблюдается интенсивное красное свечение, сравнимое по яркости с флуоресценцией незамерзшего раствора. Свет излучения красный, т. е. спектр его смещен в сторону длинных волн (меньших значений энергии) по сравнению с спектром оранжевой флуоресценции. Люминесценцию в замерзшей части пробирки можно наблюдать и с помощью быстрого фосфороскопа. Это указывает на то, что излучение света обусловлено переходом возбужденных электронов с триплетного уровня на основной. Итак, вода в присутствии тиамина делает возможными и эти переходы, т. е. способствует как переходам с синглетного уровня на триплетный, так и переходам с триплетного уровня на основной.

Из этого опыта следуют два вывода: вода способствует синглет-триплетным переходам, и вероятность этих переходов может быть изменена добавленными веществами. Таким образом, эти переходы поддаются регулирующим воздействиям, и если эти возбужденные состояния играют

важную роль в биологии, то они должны контролироваться гормонами, изменяться лекарствами или нарушаться в патологических условиях, что вызывает болезни.

Спектр красной фосфоресценции родамина смещен на 35 м μ в сторону длинных волн по сравнению со спектром его флуоресценции, так как триплетный уровень обычно лежит несколько ниже синглетного. Как показано на рис. 5, в незамерзшем состоянии молекула родамина возбуждается ультрафиолетовыми лучами на свой высший уровень S_2 , переходит в процессе «внутренней конверсии» на S_1 и отсюда на G , излучая избыток энергии в виде света флуоресценции. В замерзшей части второй пробирки, как видно из рис. 5, электрон переходит с уровня S_2 на уровень T_1 , а затем отсюда возвращается в основное состояние G , излучая энергию в виде света фосфоресценции. Переходит ли он с S_2 на T_1 через S_1 или T_2 , это остается неизвестным.

При более детальном рассмотрении пробирки, содержащей в растворе смесь родамина с тиаминном, в ней можно различить три зоны: зону флуоресцирующей жидкости наверху, фосфоресцирующую зону внизу и разделяющую их зону, не излучающую света. Эта промежуточная зона имеет промежуточную температуру. Переходную нелюминесцирующую фазу мы можем наблюдать также при постепенном охлаждении нашего раствора. При охлаждении флуоресценция исчезает прежде, чем возникает фосфоресценция. Фосфоресцентное излучение возникает только тогда, когда пробирка достигает низкой температуры. Оно усиливается, когда мы переходим от сухого льда к жидкому азоту, который примерно на 100°C холоднее. Можно было бы ожидать, что излучение будет ослабевать при охлаждении и усиливаться при нагревании. Однако в действительности происходит противоположное, и это указывает на то, что излучение света не требует энергии активации.

Можно произвести аналогичные опыты и с раствором рибофлавин-5'-фосфата в концентрации $10^{-3}M$ *). Результаты получаются примерно такими же, как в первом слу-

чае: в верхней (незамерзшей) части наблюдается хорошо известная яркая желтовато-зеленая флуоресценция, тогда как нижняя (замерзшая) часть вообще не излучает света. Это происходит, однако, лишь в том случае, если до охлаждения кислород был удален из раствора продуванием азота. Если же произвести охлаждение при наличии растворенного атмосферного кислорода, то в замерзшей части пробирки наблюдается оранжевая фосфоресценция. На флуоресценцию в незамерзающей части раствора присутствие кислорода не влияет. Кислород, таким образом, делает триплетное состояние нестабильным и стимулирует излучение света, «разрешая» возбужденным электронам вернуться с их низшего триплетного состояния на основной уровень с излучением излишней энергии в виде фотонов.

Если в пробирку с рибофлавином и атмосферным кислородом ввести йодистый калий в концентрации $10^{-3}M$, то фосфоресценция полностью «тушится». Таким образом, переходы подаются двустороннему регулируемому воздействию; это видно из того, что O_2 и I^- производят противоположное действие. Если кислород стабилизирует триплетное состояние и способствует $T \rightarrow G$ -переходам, то ион йода препятствует им. Такой антагонистический эффект может быть произведен различными веществами. Адреналин, например, уничтожает слабую фосфоресценцию замерзшего родамина при концентрации $10^{-5}M$, тогда как ацетилхолин усиливает ее, так что усиливающий эффект $0,0025M$ ацетилхолина может быть компенсирован $10^{-4}M$ адреналина. Адреналин тушит фосфоресценцию рибофлавина при концентрации $10^{-5}M$.

Излучение света водным раствором рибофлавина, замороженным без предварительного удаления кислорода, было ранее исследовано Дэрэ и Кастелли, которые правильно интерпретировали его как фосфоресценцию.

Мы можем подвести теперь некоторые итоги, сказав, что вода вызывает глубокие изменения в возбужденном состоянии двух изученных флуоресцирующих веществ, делая возможным запрещенные переходы. Возникает вопрос: представляет ли собой поведение родамина и рибофлавина некоторое общее правило или мы натолкнулись на два специфически ведущих себя вещества? Насколько мне показывает мой опыт, мы имеем здесь дело с общим прави-

*) Необходимо применять свежие растворы. Рибофлавин светочувствителен, но даже при хранении в темноте и в охлажденном состоянии он теряет свою фосфоресценцию без снижения флуоресценции. Потеря фосфоресценции, очевидно, связана с тонкими свойствами молекулы.

лом. Все исследованные флуоресцирующие вещества в замороженных водных растворах проявляют столь же необычные свойства. Можно привести следующие примеры: при замораживании водного раствора в сухом льду зеленовато-желтая флуоресценция акридиноранжа уступает место оранжевой фосфоресценции. То же самое происходит с акридином желтым. При охлаждении ниже 0°C желтая флуоресценция исчезает и всякое излучение света пропадает. При дальнейшем охлаждении возникает оранжевое излучение, которое достигает значительной интенсивности при температуре около -50°C . В акридине желтом это излучение исходит из долгоживущих возбужденных состояний, так как оно очень интенсивно даже при наблюдении в медленно вращающемся фосфороскопе. Если пробирку осветить ртутной лампой, а затем прервать освещение, то в замерзшем растворе наблюдается сильное послесвечение, длящееся несколько секунд *). Пиронин В, краситель, близкий к родамину В и обладающий в жидком растворе оранжево-желтой флуоресценцией, теряет (как и родамин) всякое излучение, как только вода замерзает. Никакого излучения не наблюдается даже при температуре сухого льда. Однако в присутствии 1% глюкозы при температуре ниже -40°C возникает сильное красное свечение, исходящее из долгоживущих возбужденных состояний, что доказывается сильным послесвечением. Акридин красный, эозин Y, тетрабромфлуоресцеин, розовая бенгальская, желтый титан — во всех этих красителях происходят аналогичные резкие изменения флуоресценции при замораживании. Эти изменения не ограничиваются красителями. Насыщенный водный раствор акридина, имеющий синюю флуоресценцию при комнатной температуре, излучает сильную оранжевую фосфоресценцию при замораживании в сухом льду. Синяя флуоресценция фолиевой кислоты исчезает при замораживании. Атербин ($0,0005\text{ M}$), имеющий интенсивную желтовато-зеленую флуоресценцию в воде, в замороженном состоянии излучает оранжево-зеленый свет, который, как можно показать добавлением к раствору до замораживания 1% глюкозы, состоит из желтой флуорес-

*) При этих наблюдениях или исследовании излучения света с помощью фосфороскопа между лампой и веществом не ставятся светофильтры.

ценции и красной фосфоресценции. При непосредственном наблюдении люминесценция замороженной системы имеет желто-зеленый цвет, тогда как в фосфороскопе система давала интенсивную красную фосфоресценцию, исходящую из долгоживущего возбужденного состояния. В хинине и хинидине интенсивная голубая флуоресценция при низких температурах исчезает, уступая место белесо-голубой фосфоресценции. «Белесость» означает смешанный цвет, желтая компонента которого может быть интенсифицирована замораживанием раствора алкалоида в присутствии 10^{-3} M йодистого калия. В лисергиновой кислоте (10^{-4} M) голубой свет флуоресценции водного раствора превращается при замораживании в пурпурный, и можно показать, что в присутствии 1% глюкозы, кроме флуоресценции, имеет место интенсивная долгоживущая фосфоресценция.

Такие изменения не ограничены флуоресцирующими веществами. Например, изопентахин, если его заморозить в сухом льде, излучает под действием ультрафиолетовой лампы сильный оранжевый свет. Это излучение состоит из желтой флуоресценции (которая может быть сильно увеличена добавкой 10% глюкозы) и красной фосфоресценции, которая отчетливо наблюдается в быстром фосфороскопе и может быть увеличена добавлением 10^{-3} M глутатиона. Замерзший голубой краситель тетразолиум излучает оранжево-зеленый свет, состоящий из зеленой флуоресценции и видимой в быстром фосфороскопе красной фосфоресценции. Хлорофилл ведет себя, как и другие флуоресцирующие красители: при его замораживании водный раствор полностью теряет свою ярко красную флуоресценцию *).

Во всех случаях излученный свет, наблюдаемый при охлаждении, имеет большую длину волны, чем свет флуоресценции незамерзшего раствора. Спектр фосфоресценции, как правило, смещен в сторону больших длин волны по сравнению с соответствующей флуоресценцией. Было известно, что спектр имеет тенденцию изменяться в длинноволновую сторону при интенсивном охлаждении, но тот факт, что вода полностью и существенно меняет ситуацию, насколько я знаю, не был известен и оценен.

*) Препарат «Chlorophyll, water soluble» фирмы Fisher Scientific Co., New York.

Эти эксперименты так просты, что они должны быть повторены каждым интересующимся этой областью. Их следовало бы повторить даже в аудиториях. Для их проведения не нужно никаких приспособлений, кроме ультрафиолетовой лампы и сухого льда. Прodelать эксперимент — это не то же самое, что прочесть о нем. Эти эксперименты создают впечатление нового красочного мира, неожиданно раскрывающегося и обещающего более глубокое проникновение в понимание механизмов жизни и их взаимодействия с ее матрицей — водой.

6. ВОЗБУЖДЕНИЕ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ МАТРИЦА

Первый вопрос, на который мы должны дать ответ в связи с изложенными в предыдущем параграфе экспериментами, касается роли воды, которая совместно с низкими температурами производит такие разительные изменения. Из полученных результатов видно, что действия воды и охлаждения не аддитивны и что при совместном воздействии они производят нечто специфичное. Сами по себе как вода, так и холод не оказывают никакого влияния. Так, при комнатной температуре ничто не изменится, если в качестве растворителя применить вместо глицерина воду; само по себе охлаждение также ничего не изменит, если в качестве растворителя применить глицерин или 10%-ный водный раствор глицерина. То, что температура сама по себе не производит действия, ясно и из того, что поведение родамина и рибофлавина по существу одинаково, независимо от того, применяем ли мы для охлаждения сухой лед или жидкий азот, хотя их температуры разнятся более чем на 100°C . Таким образом, очевидно, что лишь совместное действие воды и охлаждения порождает нечто новое. Этим новым вряд ли может быть что-либо иное, кроме образования льда. Что это так, ясно из температурного хода наблюдаемого явления. Мы должны различать две реакции: переход возбужденной молекулы в триплетное состояние и излучение ею света фосфоресценции. Обе эти реакции различным образом зависят от температуры. Например, раствор родамина, охлажденный до -78°C , имеет слабое красное свечение. Если его постепенно нагревать, то свечение исчезает при температуре около -40°C . Выше -40°C фос-

форесценция не имеет места. Флуоресценция же не возникает до температуры таяния льда. Следовательно, в этом температурном интервале всякое излучение отсутствует. Флуоресценция появляется только тогда, когда начинается таяние льда. Таким образом, триплетное состояние стабильно, пока лед не начинает таять. В нашем эксперименте для перевода молекул в триплетное состояние нет необходимости в сильном и быстром охлаждении. Достаточно замораживания до -1°C . Но такое медленное замораживание будет способствовать образованию чистого льда и выкристаллизовыванию красителя в малом объеме материнского раствора. Сильное замораживание необходимо для того, чтобы краситель вмерз в быстро образующиеся кристаллы, но после того, как это произойдет, мы можем поддерживать триплетное состояние даже при температуре плавления льда. То же самое имеет место и для других изученных веществ, таких, как, например, акридин-оранж, акридин, хинидин и рибофлавин. Излучение в этих веществах исчезает при разных температурах: в акридин-оранже около -20°C , в рибофлавине около -3°C ; голубое излучение чистого хинидина и желтое его излучение в присутствии $0,001\text{ M}$ йодистого калия исчезает около -20°C . Таким образом, действительный цвет триплетного излучения лучше всего виден при температуре плавления, когда лед оптически более однороден.

Ясно, что для триплетного состояния важна не низкая температура, а физическое состояние воды, т. е. образование льда. Лед не является просто затвердевшей водой. Как известно, современная физика подчеркивает не столько понятия «твердое» и «жидкое», сколько понятия «регулярное» и «беспорядочное»; «твердое состояние» определяется не столько тем, что в нем частицы вещества не могут двигаться друг относительно друга, сколько тем, что они образуют регулярную структуру, кристаллическую решетку; это возможно лишь в том случае, когда относительное положение частиц фиксировано и регулярность не нарушается тепловыми возмущениями. Стекло, хотя является твердым и не течет при комнатной температуре, не имеет регулярной структуры и поэтому рассматривается физиками скорее как переохлажденная жидкость высокой вязкости, чем как твердое тело. То же относится и к глицерину, превращаю-

шемся при низких температурах в твердое «стекло». Лед же — это настоящее твердое тело с регулярной гексагональной кристаллической структурой несмотря на то, что он легко меняет свою форму и «течет», как это явствует из движения ледников и из опытов Гельмгольца. Сильный дипольный характер молекул воды придает ее кристаллам особые свойства, и наиболее резонно предположить, что переходы наших возбужденных молекул в «запрещенное» триплетное состояние становятся возможными в результате взаимодействия этих молекул и их возбужденных электронов с кристаллической решеткой этого странного вещества — воды.

Этим объясняется, почему при замораживании раствора нашего флуоресцирующего вещества в глицерине не наблюдается никаких резких изменений его флуоресценции; глицерин может при низких температурах образовывать твердую массу, но он не образует кристаллов. Это объясняет также, почему добавление 10% глицерина или 2% метанола к воде лишает ее специфического действия на возбужденные состояния: такая примесь нарушает регулярность кристаллов воды.

Рассматривая структуру воды, мы попадаем в фантастический и чарующий мир. Бриджмен в своих работах с высоким давлением различал до десятка различных льдов. Однако нет необходимости обращаться ко льду для выяснения структуры воды. Берналл и Фаулер в своей классической работе показали, что вода имеет кварцеподобную «кристаллическую» структуру, отличную от тридимитоподобной структуры обычного льда. Хотя теория Берналла и Фаулера была несколько изменена последующими исследователями, однако правильность ее по существу никогда не подвергалась сомнению. В молекуле H_2O центральный атом О удерживает два протона с одной стороны, что придает молекуле большой дипольный момент. Орбиты уединенной пары электронов вытянуты в другую сторону и усиливают дипольный характер молекулы (Попль). Два протона связывают молекулу с двумя соседними молекулами водородными связями, тогда как пара уединенных электронов притягивает два протона от двух других молекул H_2O , так что каждая молекула воды оказывается связанной с четырьмя другими. Так как четыре орбиты, обуславливающие эти

связи, расположены почти под тетраэдрическими углами, то образуется тетраэдральная решетка. Если вода в этом состоянии все еще остается жидкой, то это обусловлено тем, что связи могут быть разорваны и, как подчеркивает Попль, слегка изогнуты. Выше 0°C тепловое возмущение не дает молекулам возможности образовать постоянную жесткую решетку, но все же тенденция к этому имеется, в результате чего вода находится в «квази-кристаллическом» состоянии. Вода как будто имеет две точки плавления: одну при 0°C , когда она превращается из твердого кристалла, так сказать, в жидкий; вторая точка плавления находится между 30 и 40°C ; при этой температуре под влиянием интенсивного теплового возмущения кристаллическая структура полностью исчезает (Фитс и Айвс). Возможно, что природа стабилизировала температуру тела высших теплокровных организмов около 37°C , чтобы позволить их клеткам образовывать кристаллическую водную структуру по своему собственному усмотрению.

Ситуация усложняется при рассмотрении структуры воды, возникающей возле твердых поверхностей. Образование возле поверхностей структурно-упорядоченных слоев, распространяющихся далеко в глубь жидкой фазы, очевидно, является общей тенденцией жидкостей. Эта проблема имеет также первостепенное практическое значение в связи с изучением процессов смазки. Хенникер и Мак-Байн собрали в 1947 г. до 175 работ по таким слоям и пришли к выводу, что для многих жидкостей характерна «глубокая ориентация у поверхностей. Поверхностная зона жидкостей имеет толщину порядка десятков и сотен молекул, а не мономолекулярна, как обычно предполагалось». Наглядная демонстрация существования таких поверхностных слоев воды была дана позднее Пальмером, Кунлиффом и Хьюгом, которые изучали диэлектрические свойства тонких слоев воды между слюдяными пластинками и нашли, что вода ведет себя вблизи слюды не как вода, а как «жидкий лед»; зависимость ее диэлектрической постоянной от частоты сходна с характеристиками льда. Было установлено, что толщина этих слоев льда достигает нескольких микрон.

Образование таких водных структур не надо смешивать со старым представлением о «связанной воде». «Связывание» включает в себя скорее идею энергии, чем структуры.

«Связывание» означает определенную силу, энергию, необходимую для перемещения молекулы от места ее расположения. Такие «связанные» молекулы, дипольные силы которых заняты, не могут служить растворителями для других молекул. Подобное связывание особенно сильно вблизи свободных зарядов, например ионов. В этом случае можно говорить лишь об упорядоченности «близкого порядка», так как число слоев более сильно связанных молекул очень мало (всего 1—2 слоя). В отличие от этого образование решетки подразумевает «дальний порядок», в котором отдельные молекулы сотрудничают коллективно.

Образование подобной водной структуры возможно не только вблизи отчетливых межфазных поверхностей, таких, как поверхность раздела воды и слюды. Такая структура может возникнуть и, наверное, возникает возле любых растворенных молекул. Франк и Ивэнс ввели для этого фигуральное название «айсберг», пытаясь выразить им то, что молекулы, растворенные в воде, окружены такой структурой. Измерения Франка и Ивэнса показывают, что такими айсбергами окружают себя не только электрополярные, но и аполярные молекулы. Как сообщалось позже в интересной статье Басуэла и Роденбуша, лед, образованный вокруг гомеополярной молекулы, отличен от обычного гексагонального льда, он имеет весьма рыхло упакованную структуру с кубической решеткой, и поэтому образование его вызывает сильное расширение. «Такое поведение [воды] привлекло к себе внимание химиков некоторыми удивительными явлениями природы. Одним из них было то, что зерно иногда оказывалось замерзшим при температуре 40° Ф [около 4,5° С], т. е. значительно выше точки замерзания. Вторым было то, что газопроводы с природным газом даже при температуре столь высокой, как 68° Ф [20° С], часто оказывались забитыми пробками рыхлого «снега», содержащего воду». Следовательно, образование льда выше точки замерзания не просто теория, а неоспоримый факт, приносящий беспокойство промышленности.

Итак, мы можем предположить, что вокруг растворенных молекул образуются водные структуры, имеющие различное кристаллическое строение в зависимости от полярной или неполярной природы атомных групп на молекуле и расстояний между этими группами, которые связаны с по-

стоянными решетки различных возможных кристаллов воды. Вполне вероятно, что различное расположение групп порождает различные кристаллические формы или, в случае несоответствия, нарушает порядок и препятствует образованию решетки. Возможностей много, взаимоотношения сложные.

Если структуры и молекулы окружены «айсбергами», то можно ожидать, что от размеров и природы этих айсбергов будет зависеть, насколько эти молекулы могут приблизиться одна к другой и может ли растворенная молекула пройти через пору в «покрытой льдом» мембране. Два «айсберга», имеющие одинаковую структуру льда, могут сплавиться, допуская тесное соприкосновение молекул, тогда как для льдов различной природы будет иметь место обратное.

Б. Джакобсон изучил высокополимерную дезоксирибонуклеиновую кислоту и нашел, что ее поведение может быть лучше объяснено предположением о существовании «гидратной оболочки с упорядоченной решеткой», чем старой теорией ротационного эллипсоида. Большое число электрополярных групп и свободных зарядов у этих молекул весьма благоприятствует образованию водной структуры. Нитевидная форма также благоприятствует этому, тогда как глобулярная форма не благоприятствует образованию структурной воды. Вполне возможно, что подвижные глобулярные белковые молекулы построены так именно для того, чтобы избежать образования айсбергов, которые могли бы снижать их подвижность. Так как структурные белки фибриллярны и плотно упакованы, то очевидно, что вода между ними находится в высокоупорядоченном состоянии. Берналл и Фаулер ввели представление о «структурной температуре», определяемой как температура, при которой свободная вода имеет ту же степень упорядоченности, что и вода, включенная в рассматриваемую систему. Мы должны ожидать, что эта «структурная температура» в протоплазматических образованиях должна быть довольно низка. Выражаясь словами Джакобсона (1955), образование такой водной структуры «ведет к изменению физических свойств всей системы, качественно сходному с изменением свойств чистой воды при понижении температуры». Все это вместе взятое означает, что вода внутри клетки может

быть не разупорядоченной водой, а «жидким льдом», делающим триплетные состояния, наблюдаемые в замерзшей воде, наиболее вероятной формой возбуждения в тканях.

Однако до сих пор не было сделано ни одной попытки применить наши знания о структуре воды к живым системам или показать существование триплетного возбуждения в биологических процессах. Существуют лишь спорадические наблюдения, наводящие на различные предположения. Гергели (1947 г., стр. 101) обнаружил, что акридин-оранж, растворенный в воде, обладает фосфоресценцией, если к раствору добавить актомиозин. Менее фибриллярные миозин или актин оказались менее активными в этом отношении. Гергели применял актомиозин в сравнительно малой концентрации, так что мы можем ожидать, что в мышце при высокой концентрации белков триплетные возбужденные состояния будут еще более вероятны. Я нашел, что свежая мышца лягушки или рыбы, погруженная в 0,1 М KCl и окрашенная акридин-оранжем (10^{-3} М), при освещении (при комнатной температуре) обладает оранжевой фосфоресценцией красителя, в то время как краситель, извлеченный из мышцы фильтровальной бумагой, обладает лишь обычной желтовато-зеленой флуоресценцией. Если мышцы привести в сокращение замораживанием и последующим оттаиванием, то фосфоресценция исчезает, что указывает на нарушение водной структуры. Большое количество жидкости, выжимаемое такой мышцей, также указывает, что физическое состояние воды претерпело сильные изменения. Применение в качестве суспензионной жидкости вместо раствора KCl децимолярного раствора NaCl снижает фосфоресценцию. Как будет показано в дальнейшем, Na нарушает водную структуру.

Изучение воды в связи с ее биологической структурой и процессами электронного возбуждения открывает увлекательную и многообещающую область исследований, которая, возможно, поведет нас далеко в понимании нормальных и патологических процессов жизни. Действительно, структура воды выдвигает новую точку зрения на самую жизнь. До сих пор на воду смотрели, как на более или менее нейтральную среду, заполняющую пространство между структурными элементами в клетке. Согласно взгляду, развиваемому в этом параграфе, вода составляет единую

систему со структурными элементами, в которых становятся возможными электронные возбужденные состояния, весьма маловероятные без нее. Протоплазматические системы, в которых возникают эти возбуждения, создают и водную структуру, необходимую для возникновения, а также для распространения возбуждения. Биологические функции могут фактически заключаться в образовании и нарушении водной структуры; вода — неотъемлемая часть живой машины, а не просто ее среда; водные структуры и их взаимодействия с электронными возбуждениями тесно связаны с самой сущностью «живого состояния».

Один из основных принципов биологии — организация; это означает, что две системы, составленные вместе определенным образом, составляют новую единицу, систему, свойства которой не аддитивны и не могут быть описаны посредством свойств составляющих. Как точки относятся к буквам, буквы к словам, слова к предложениям и т. д., так атомы соединяются в молекулы, молекулы в органеллы, органеллы в клетки и т. д. Каждый уровень организации имеет новое, свое собственное значение и открывает захватывающие перспективы и возможности. Живое вещество является как бы системой из воды и органического вещества, которые составляют, как шестеренки в часах, одну единую неразделимую единицу — систему.

Вода не только *mater* (мать), но также и *matrix* (матрица) жизни, и биология, возможно, не преуспела до сих пор в понимании наиболее основных функций из-за того, что она концентрировала свое внимание только на веществе в виде частиц, отделяя их от двух матриц — воды и электромагнитного поля.

Можно добавить одно критическое замечание к содержанию двух последних параграфов: нет окончательных доказательств того, что долгоживущие возбужденные состояния, наблюдаемые во льду, это, действительно, триплетные состояния, а не какие-либо неизвестные формы возбуждения. Триплеты не являются единственно известными долгоживущими возбуждениями, о чем свидетельствуют люминесцирующие цифры на циферблате наручных часов. В этом случае затяжное излучение света принадлежит так называемым кристаллофосфорам. В кристаллах орбиты единичных атомов и молекул могут сплавиться в непрерывные полосы,

или зоны. Когда электроны возбуждаются и переходят в верхнюю энергетическую зону, они могут быть задержаны там и упасть вниз на основной уровень с некоторой задержкой, излучая излишек энергии в виде фотона *). Долгоживущие возбужденные состояния имеют место также в так называемых «желатиновых фосфорах», которые могут быть приготовлены сушкой флуоресцентного красителя в присутствии белка, например желатина **). Но если бы даже долгоживущие возбуждения, описанные в двух последних параграфах, в тех или иных случаях оказались связанными не с переходами в триплетное состояние, а с какой-то другой формой энергии возбуждения E^* , то это мало повлияло бы на наш основной вывод о том, что в структурированной воде электронное возбуждение способно принимать необычайно долгоживущую форму, которая может иметь первостепенное значение для биологической передачи энергии.

Имеющиеся в настоящее время доказательства склоняют нас к предположению, что наблюдаемые возбужденные состояния представляют собой триплетные состояния. Это также подкрепляет заключение, к которому мы пришли во втором параграфе данной книги, а именно, что схема энергетики живого мира в основном состоит только из двух частей: фотосинтеза и противоположного ему процесса. Мы получаем все больше доказательств того, что при фотосинтезе молекулы хлорофилла, возбужденные светом до синглетного уровня, до использования энергии этого состояния переходят в триплетное состояние. В наших экспериментах *in vitro* хлорофилл вел себя в замороженных водных растворах так же, как и другие флуоресцирующие кра-

*) Это описание процесса кристаллофосфоресценции слишком поверхностно и неточно. Длительное послесвечение кристаллофосфоров обусловлено в основном не длительным пребыванием электронов в верхней энергетической зоне (зоне проводимости), а локализацией их на так называемых «уровнях захвата», или «ловушках», создаваемых в кристалле примесями или местными нарушениями правильности кристаллической решетки. Обратные переходы с ловушек в зону проводимости требуют некоторой энергии активации, и потому электроны могут оставаться на них длительное время. Свечение возникает при рекомбинации электрона, находящегося в зоне проводимости, с ионизированным центром свечения, связанным с атомом введенного в основную решетку металла-активатора (Mn, Cu, Ag и др.) (Прим. ред.)

**) В этих случаях мы, по-видимому, имеем дело с теми же переходами возбужденных молекул на триплетные уровни. (Прим. ред.)

сители, переходя, по всей вероятности, в триплетное возбужденное состояние. Таким образом, по-видимому, накапливается все больше доводов в пользу предположения, что триплетные состояния являются основным средством передачи энергии как в фотосинтезе, так и в биологических процессах, в которых происходит потребление энергии, что еще больше увеличивает аналогию между этими двумя процессами. Кажется вероятным, что возможность возбуждения молекулы хлорофилла в хлоропласте на триплетный уровень становится реальным фактом и эти состояния стабилизируются благодаря окружающей водной структуре. Это взаимодействие триплетов и воды может также открыть путь к пониманию механизма, с помощью которого E^* хлорофилла используется для расщепления воды на ее элементы, что является основой фотосинтеза. Как будет показано в дальнейшем, триплетные возбуждения во льду стабилизируются SH-группами. Это может помочь понять роль тиоктоловой кислоты, восстановление которой, по теории Кэлвина, является первым этапом цепи темновых окислительно-восстановительных реакций при фотосинтезе.

Я рассмотрел здесь лишь те изменения, которые могут произойти при замораживании в растворителе, воде, но изменения могут произойти и в флуоресцирующем веществе. Например, при замораживании вода выкристаллизовывается, и это приводит к возрастанию локальной концентрации растворенного вещества, в результате чего может возникнуть концентрационное тушение (или полимеризация), которое сильно изменит возбужденное состояние и излучение света. Такого рода случаи будут рассмотрены ниже.

7. ТУШЕНИЕ И ТУШИТЕЛИ

Изучая биологический процесс, мы обычно стараемся по возможности предохранить наш материал от повреждения. Но можно поступить и наоборот — произвести повреждение определенными ядами и сделать заключения из соответствующих изменений в функции. Аналогичным образом мы можем попытаться найти яд для E^* .

Излучение света, будь то флуоресценция или фосфоресценция, указывает на наличие электронного возбуждения, и если то или иное вещество тушит люминесценцию, то оно

должно взаимодействовать с соответствующей E^* . Если E^* участвует в биологическом процессе, то и этот процесс должен быть отравлен тушителем. Таким образом, высокоактивные и специфические тушители могут помочь нам в нашем исследовании, и возникает вопрос: как найти их?

Известно, что некоторые атомы и их комбинации производят тушащее действие. Такими атомами являются йод и, в меньшей степени, бром. Группы SCN и NO_3 также известны как тушители, и это наводит на мысль, что комбинации атомов с несвязанной «уединенной» парой электронов обуславливают способность тушения. Такими атомами являются O, N, и S. Активность этих атомов и атомных комбинаций проявляется также в сильной абсорбции в ультрафиолете.

Эти простые тушители нам не особенно полезны отчасти потому, что их активность недостаточно велика, а отчасти и потому, что они не обладают специфическим сродством к элементам ткани, которое могло бы обусловить их специфическое действие. Такая специфичность требует более сложной химической структуры. В наших поисках тушителей с такой структурой мы можем использовать тот факт, что упомянутые простые атомы или атомные группы обычно тушат флуоресценцию даже и тогда, когда они введены в более сложную флуоресцирующую молекулу. Они облегчают процесс диссипации энергии в возбужденной молекуле. Фигурально выражаясь, они играют роль стока для E^* . В такой молекуле может происходить диссипация не только ее собственной энергии E^* , но и энергии других молекул, которую она может от них получить. В этом случае эта молекула будет тушителем. Мы надеемся, что таким путем можно прийти к молекулам, которые обладают не только желательным тушащим действием, но и избирательным сродством.

Приведем пример: известно, что бензол слабо флуоресцирует, но если в его молекулу ввести группу NO_2 , то полученный нитробензол уже не будет флуоресцировать, хотя он и еще более возбужден, чем сам бензол, если судить по его сильной абсорбции в ультрафиолете и в синей части спектра. Группа NO_2 как «хромофорная» группа, облегчает молекуле собирание энергии. Действуя своей системой сопряженных двойных связей, словно антенной, молекула электродинамически связывается с окружающей средой и

получает от нее энергию. Забирая E^* от других молекул, она тем самым играет роль их тушителей, группа же NO_2 облегчает диссипацию полученной таким путем энергии E^* , т. е. переход ее в тепло.

Мы можем еще более увеличить тушащую способность, а также и специфичность нашей молекулы, вводя дополнительные группы NO_2 в точках, наиболее подходящих для резонанса, или вводя группы электронных доноров, таких, как OH, или, наконец, расширяя резонансную систему добавлением к ней одного или нескольких бензольных колец. Эта идея ведет нас в заманчивую область биологии. Создавая такие тушители, мы, возможно, последуем той же дорогой, которой шла природа, создавая тироксин и родственные ему вещества и вводя йод в их обширную резонирующую ароматическую структуру.

Эти рассуждения приводят нас также к одной из самых интересных загадок современной биохимии — к 2,4-динитрофенолу. Это вещество (рис. 6, а) нарушает сопряжение реакций окисления и фосфорилирования в процессе так называемого окислительного фосфорилирования, при котором освобождающаяся энергия пищевых веществ аккумулируется в молекуле АТФ. Митохондрии в присутствии этого вещества продолжают окислять пищевые вещества, иногда даже с увеличенной скоростью, но высвобожденную таким образом энергию они растрачивают в виде тепла. Это привело к тому, что несколько десятилетий тому назад динитрофенол сделался наиболее модным лекарством для похудения. Однако применение его в медицине вскоре прекратилось, так как, к сожалению, в некоторых случаях он каким-то образом вызывал катаракту и большинство людей предпочло быть толстыми или голодными, чем ослепнуть.

Механизм действия динитрофенола еще более поразителен тем, что он действует не только на окислительное фосфорилирование, но, по-видимому, и на все процессы, в которых имеет место перенос и использование энергии.

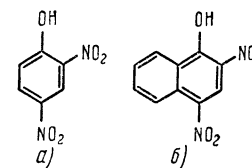


Рис. 6. а) 2,4-динитрофенол; б) 2,4-динитро-1-нафтол.

Он ингибирует различные процессы при фотосинтезе, а также «насосную активность» клеточной мембраны, в которой совершается осмотическая или электрическая работа. Эти реакции столь различны, что кажется невозможным привести их к общему знаменателю в рамках химии. Единственное, что имеется общего у этих реакций, это лишь то, что в них тем или иным путем происходит перенос энергии. Это делает вполне вероятным предположение о том, что динитрофенол участвует не в одной определенной химической реакции, а действует посредством некоторого общего физического принципа, каковым является тушение E^* . В этом отношении интересно отметить, что как 2,4-динитрофенол, так и 2,4-динитро-1-нафтол (рис. 6, б) имеют широкую полосу абсорбции в близкой инфракрасной части спектра. Динитронафтол — это в сущности тот же динитрофенол с добавленной лишней антенной.

Мак-Лафлин и автор измерили тушение флуоресценции ароматического углерода хризена различными ароматическими нитропроизводными и нашли, что динитронафтол более активен, чем динитрофенол. К сожалению, их методы не дали возможности отличить действительное тушение от простой конкуренции за свет между тушителем и флуоресцирующим веществом. Кэррмэн и Стил повторили эти измерения более адекватными методами. Их результаты показали, что как динитрофенол, так и динитронафтол являются действительными тушителями. Наблюдаемое тушение нельзя считать лишь дезактивацией при столкновениях, частично оно должно быть резонансным тушением, происходящим не при столкновении, а путем резонансного переноса E^* . Флуоресценция, в общем, очень мало чувствительна к тушению, что легко объяснить краткостью времени жизни синглетного возбужденного состояния. Однако флуоресценция сама по себе и не представляет непосредственного интереса для нашей проблемы. Если E^* играет роль в биологии, то она должна существовать в форме триплета, как это было показано в предыдущих параграфах. Мною установлено, что триплетные состояния наиболее чувствительны к тушителям, некоторые из которых подавляют фосфоресценцию даже при высоком разведении. Нечувствительность флуоресценции можно с успехом применить для показа того, что наблюдаемое тушение фосфоресценции есть «дей-

ствительное тушение» и что излучение света исчезает не только потому, что тушитель поглощает возбуждающий свет. Если бы это было так, то тушилась бы также и флуоресценция. Описанные же тушители в примененных концентрациях не снижают заметно флуоресценции и, следовательно, их тушение является «действительным». Тушащее действие может иметь различные механизмы. В настоящее время мы лучше воздержимся от интерпретации этих механизмов и будем довольствоваться фактом, что тушение, т. е. подавление излучения света, должно заключать в себе взаимодействие с E^* , а взаимодействие с E^* должно означать взаимодействие с биологической функцией, если E^* играет в ней важную роль.

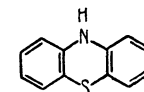


Рис. 7. Фенотиазин.

Одним из сильнейших неорганических тушителей является ион SCN^- , который подавляет фосфоресценцию рибофлавина при концентрации 10^{-4} М. Комбинация атомов SCN не играет никакой роли в органической химии. Однако близкая к ней группа $SC=CN$ является ядром фенотиазина (рис. 7), в котором она представляет центр обширной системы сопряженных двойных связей. Сам фенотиазин непригоден для экспериментов вследствие нерастворимости в воде. Пирролазот (рис. 8) более растворим. Было найдено, что фосфоресценция родамина, акридина и рибофлавинфосфата полностью тушится этим веществом при концентрации $3 \cdot 10^{-4}$ М, в то время как флуоресценция незамороженного раствора при этом не изменяется.

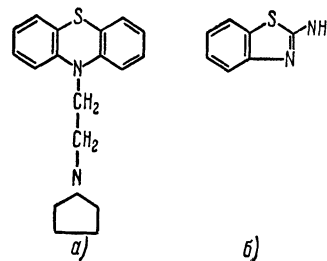
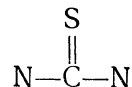


Рис. 8. а) Пирролазот; б) амино-бензотиазол.

То, что это действие пирролазота действительно обусловлено наличием комбинации атомов S, C и N, может быть показано испытанием 2-аминобензотиазола, который содержит те же атомы, но в другой последовательности и разделенные лишь одним C (рис. 8, б). Это вещество тушит фосфоресценцию акридина при концентрации 0,005 М, а рибофлавина — при 10^{-5} М.

Как известно, пирролазот не обладает специфическим фармакологическим действием, что говорит об отсутствии у него специфического сродства к компонентам ткани или клеток. Но если он воздействует на E^* , а E^* необходима для жизни, то он должен убить животное при достижении тех концентраций, в которых он воздействует на E^* , и, наоборот, если он убивает животное, воздействуя на E^* , то он также должен тушить E^* *in vitro* в тех концентрациях, которые устанавливаются в животном при летальной дозе. Эксперимент показал, что при введении в мышь 100 мг на 1 кг веса тела симптомы не проявляются, тогда как 200 мг на 1 кг убивает животное; 200 мг на 1 кг соответствуют средней концентрации в $6 \cdot 10^{-4} M$. Фосфоресценция родамина и акридина тушится при концентрации $3 \cdot 10^{-4} M$.

Интересно было бы знать, в какой мере фармакологическое действие других веществ, содержащих атомы S, C, и N в близком соседстве, обусловлено действием этой атомной комбинации на E^* . Тиомочевина и тиюрацил содержат группу



6-меркаптопурин, известный своей антикарциногенной активностью, не воздействует на возбуждение или флуоресценцию родамина, но полностью тушит фосфоресценцию рибофлавина при концентрации $6 \cdot 10^{-5} M$ и производит умеренное тушащее действие на фосфоресценцию акридина. Таким образом, его действие проявляет определенную специфичность. Вполне возможно, что меркаптопуриновая молекула, встроенная в нуклеиновую кислоту, препятствует переносу энергии вдоль стопки пуриновых и пиримидиновых оснований, которые составляют сердцевину ДНК в модели Ватсона—Крика. Такое действие должно быть аналогично действию гидрохинона, который пресекает передачу энергии вдоль шейбовских стопок изоцианиновых красителей (см. стр. 31).

Другой атомной группой, относительно которой известно, что при введении в молекулу флуоресцирующего вещества она тушит флуоресценцию, является группа $\text{N}=\text{N}$. Соответственно сказанному, мы можем ожидать, что

удастся найти сильные тушители среди азосоединений. Мак-Лафлин и автор установили, что в то время, как диазобензол является слабым тушителем, аминоксантил (толуазотолуидин) высокоактивен. Действие последнего вещества, так же как и масляной желтой (butter yellow), трудно оценить из-за его нерастворимости в воде. Оба как будто тушат фосфоресценцию рибофлавина, но неактивны по отношению к родамину.

8. РАЗЛИЧНЫЕ НАБЛЮДЕНИЯ

В этом параграфе я кратко опишу несколько не лишенных интереса наблюдений, хотя их связь с основной темой книги не всегда очевидна.

Н а р к о з

С тех пор как Овертон предложил свою теорию, наркомом занималось немало исследователей. Многие из них выдвинули свои собственные новые теории. Это периодическое возникновение различных теорий говорит о том, что ни одна из них не получила общего признания, и мы до сих пор все еще не знаем, что же такое наркоз. Если наша теория относительно E^* правильна, то можно ожидать, что с ее помощью различные старые неразрешенные проблемы представятся в новом свете. Следовательно, мы можем поставить вопрос о том, может ли наша теория что-либо подсказать относительно наркоза.

Водный раствор акридин-оранжа ($10^{-4} M$) обнаруживает под ультрафиолетовой лампой зеленовато-желтую флуоресценцию. При замораживании флуоресценцию заменяет очень слабая коричневатая фосфоресценция. Так же как и в случае родамина, эта фосфоресценция может быть усилена добавленными веществами до ярко-красного излучения. В этой системе медленный фосфороскоп не обнаруживает длительной фосфоресценции.

Если мы растворим краситель вместо чистой воды в насыщенном водном растворе кортизона, то мы не только обнаружим некоторое усиление слабой фосфоресценции, но и увидим, что время ее жизни сильно возрастает. При наблюдении с помощью медленного фосфороскопа пробирака

оказывается сильно люминесцирующей; если внезапно прервать ее освещение, то можно и невооруженным глазом наблюдать сильное послесвечение. Таким образом, взаимодействие воды и красителя изменено стеринам, который присутствует в очень низкой концентрации, так как кортизон очень слабо растворим в воде ($6,5 \cdot 10^{-5} M$). Непосредственное взаимодействие между красителем и стеринам маловероятно, так как число молекул стерина слишком мало, а специфического сродства между молекулами стерина и красителя не наблюдалось. Можно ожидать, что молекулы стерина структурируют вокруг себя воду в кубическую решетку, и вполне резонно предположение, что увеличение времени жизни возбужденного состояния обусловлено взаимодействием возбужденных молекул и их электронов с этой кортизоно-водной системой.

Хлороформ весьма умеренно растворим в воде ($0,014 M$). И все же если 1/50 часть насыщенного водного раствора добавить к раствору кортизона и красителя, то при замораживании долгоживущая фосфоресценция не будет наблюдаться, хотя излучение света усилится, несмотря на присутствие наркотика. Можно предположить, что гидрофобный стероид притягивает молекулы хлороформа, которые изменяют его связи с водой и тем самым меняют структуру воды, ответственную за удлинение времени жизни возбужденных молекул красителя. Так как концентрация хлороформа в нашей системе очень низка ($3 \cdot 10^{-4} M$ или меньше), то вполне возможно, что этот наркотик ингибирует функцию центральной нервной системы *in vivo*, воздействуя на взаимоотношение липидов с водой, возмущая тем самым E^* , и, возможно, укорачивая длительность возбужденных состояний. Предельное проявление этого действия заключается в полном подавлении длительной фосфоресценции. Менее сильные воздействия могут привести к более тонким изменениям и могут быть ответственны за большое разнообразие симптомов, порождаемых в центральной нервной системе различными лекарствами. В предыдущих параграфах этой книги мы имели в виду лишь непосредственное взаимодействие между двумя веществами A^* и B . Вполне возможно, что по аналогии с вышеприведенным экспериментом с акридин-оранжем, кортизоном и хлороформом для понимания действия лекарства надо рассмотреть также и косвен-

ное действие, в котором лекарство, по-видимому, влияет не непосредственно на краситель, а изменяет взаимоотношение третьего вещества с водой. Конечно, это не исключает того, что возбужденные молекулы сами могут подвергнуться влиянию наркотика, если они имеют сродство к нему. Такое сродство имеет родамин В; это вытекает из того факта, что его можно удалить из воды вместе с хлороформом в виде бесцветного ангидрида. Если к водному раствору родамина добавить одну десятую часть насыщенного водного раствора хлороформа, то при последующем замораживании и освещении родамин не перейдет в триплетное состояние и не будет иметь своей обычной яркой флуоресценции. То, что эти изменения не обусловлены непосредственным возмущением воды хлороформом, доказывается тем фактом, что насыщение эфиром не производит такого эффекта, хотя эфир и имеет большую растворимость в воде, чем хлороформ. Эфир не имеет сродства к родамину, но легко уничтожает его долгоживущую фосфоресценцию, если 1/50 часть насыщенного водного раствора добавить к системе акридин-оранж—кортизон.

А с к о р б и н о в а я к и с л о т а

Мы знаем, что аскорбиновая кислота необходима для жизни, но не знаем почему, какую роль она выполняет. Если дать ей самоокислиться, то она превращается в желтый краситель, очевидно в дегидрогулоновую кислоту (см. работу Шифмана, Мак-Лафлина и автора). Двухвалентные металлы образуют с этой окисью ярко окрашенные комплексы.

Как было показано раньше, согласно экспериментальным данным, все флуоресцирующие вещества в замерзшей воде переходят в триплетное состояние. Это как будто имеет место и для данного продукта окисления аскорбиновой кислоты. Если метаноловый раствор аскорбиновой кислоты нейтрализовать ВаОН, то при хранении в присутствии воздуха образуется желтый преципитат, который является бариевой солью окиси. Если его развести в воде, то он не будет флуоресцировать видимым светом. В замороженном состоянии он проявляет сильную голубую фосфоресценцию с большим временем жизни. Окись аскорбиновой кислоты обладает способностью прочно присоединяться к белкам,

не теряя своей оптической реактивности. Возможно, что она составляет такие комплексы с протоплазматическими белками также *in vivo*, служа для них простетической группой. Это предположение находит подтверждение в том факте, что два органа, наиболее богатые аскорбиновой кислотой, — надпочечная железа и лимфатические железы — оба содержат желтый пигмент. Когда автор два десятилетия тому назад работал в этом направлении, у него создалось впечатление, что эти пигменты не могут быть отделены от структурных белков и не все являются каротинами. Возможно, что исчезновение аскорбиновой кислоты из коры надпочечников при возрастании функциональной активности связано с образованием таких белковых комплексов. Этот вопрос требует более глубокого изучения.

Долгоживущее возбуждение в белках

Замороженные ткани животных в отсутствие кислорода при освещении ультрафиолетовой лампой дают сильное и долго длящееся послесвечение. Пигменты препятствуют наблюдению этого излучения, которое наблюдается поэтому лишь в органах, бедных окрашенными веществами. Если, например, мозг морской свинки поместить в пробирку, воздух заместить азотом, пробирку погрузить в замораживающую смесь сухого льда и поддержать (после установления температурного равновесия) перед ртутной лампой высокого давления в течение секунды, то он будет излучать с полминуты интенсивный голубовато-белый свет, после чего в течение еще некоторого времени будет наблюдаться слабое свечение. В присутствии воздуха, т. е. O_2 , такая фосфоресценция не наблюдается; при комнатной температуре ткань также не испускает такого излучения. В других органах, бедных пигментами (мышцы, матка, кишечник, легкие, кожа и рак грудной железы у мышей), наблюдается то же явление. В органах же, богатых пигментами [почки, печень или темные мышцы (сердце)], излучение не наблюдается. Длительная фосфоресценция не является специфическим свойством тканей. 1%-ный раствор сыровоточного альбумина (кристаллический сыровоточный альбумин, Армор), как и 1%-ный раствор овальбумина или желатина, также фосфоресцирует, хотя в последнем случае излучение менее длительно.

Эта длительная фосфоресценция, насколько мне известно, раньше не описывалась; возможно, что она оставалась незамеченной из-за тушащего действия атмосферного кислорода. Дебай и Эдвардс описали длительную фосфоресценцию в растворах белков, но отметили, что наблюдаемая ими при температуре жидкого N_2 фосфоресценция очень чувствительна к поднятию температуры и не происходит при температуре сухого льда (которая на $100^\circ C$ выше, чем температура жидкого азота). Они считают, что фосфоресценция связана с выбрасыванием электрона, временно захваченного «ловушкой»; излучение света происходит при возвращении электрона на свой первоначальный основной уровень.

Возмущения

Водный раствор родамина имеет красноватый цвет, тогда как раствор родамина в метаноле имеет оранжевый цвет. Спектроскопическое исследование показывает, что в воде как спектр абсорбции, так и спектр эмиссии смещены на 50 м μ в сторону длинных волн. Очевидно, что это смещение связано с высокой диэлектрической постоянной воды и что разница между двумя растворителями была бы еще больше, если бы вместо метанола можно было применить менее полярный растворитель. К сожалению, этого сделать нельзя, так как в таком растворителе родамин образует бесцветный лактон, который делает резонанс невозможным и поэтому уничтожает окраску (Лундгрэн и Нинкли).

К этим наблюдениям привлекает внимание то, что аналогичные сдвиги в сторону более длинных волн могут наблюдаться, если к метаноловому раствору красителя мы добавим малые количества различных веществ, известных своей большой биологической активностью. Можно ожидать, что энергетические уровни в биологических системах настроены довольно точно, так что такого рода сдвиги энергетических уровней *in vivo* могут нарушить согласованность отдельных процессов.

Способность некоторых веществ смещать спектр метанол-родаминового раствора в сторону длинных волн была изучена Мак-Лафлином (не опубликовано). Вещество добавлялось в трех различных концентрациях: 0,01; 0,001 и 0,0001 M. Результаты приведены в табл. I, где числа

Таблица I

Сдвиг спектра родамина В, растворенного в метаноле (в ангстремах), в сторону длинных волн при добавлении различных веществ в концентрациях 0,01; 0,001 и 0,0001 М

Вещество	Молярная концентрация		
	0,01	0,001	0,0001
1. Уксусная кислота	72	68	52
2. Уксуснокислый натрий	0	0	0
3. Салициловая кислота	72	64	4
4. Салицилат натрия	16	0	0
5. Пикрат натрия	56	56	8
6. Фенол	4	0	0
7. 1-нафтол	8	0	0
8. <i>p</i> -хлорофенол	0	0	0
9. <i>o</i> -йодофенол	0	0	0
10. <i>o</i> -, <i>m</i> - и <i>p</i> -нитрофенол	0	0	0
11. <i>p</i> -нитроанилин	0	0	0
12. <i>m</i> - и <i>p</i> -динитробензол	0	0	0
13. <i>p</i> -дийодобензол	0	0	0
14. 2-амино-4-нитрофенол	0	0	0
15. 2,4-динитроанилин	0	0	0
16. 2,4-динитроанизол	0	0	0
17. 2,4-динитрофенерол	0	0	0
18. 2,4-динитрофенол	80	80	32
19. 4,6-динитро- <i>o</i> -крезол	68	60	12
20. Натриевая соль, 3,5-динитросалициловой кислоты	4	0	0
21. 2,4-динитро-1-нафтол	80	72	40
22. Натриевая соль 2,4-динитро-1-нафтол-7-сульфоновой кислоты	76	65	15
23. 2,4-дихлорофенол	0	0	0
24. 2,4-дихлорофеноксикусусная кислота Na	48	36	8
25. 2,4,5-трихлорофенол	0	0	0
26. 2,4,6-трихлорофенол	20	0	0
27. Пентахлорофенол	60	28	4
28. 2,4 дихлоро-1-нафтол	0	0	0
29. ДДТ	4	0	0
30. 3,5-дийодо-2-гидроксibenзоиновая кислота Na	68	64	8
31. 3,5-дийодо-4-гидроксibenзоиновая кислота Na	48	32	8
32. 2,4-6-трийодофенол	28	8	0
33. Дикумарол	—	—	26
34. Йодистый калий	0	0	0

обозначают сдвиг спектра абсорбции в сторону длинных волн в Å. Так как кислоты (1—4) вызывают сильный сдвиг, то все кислые вещества применялись в виде нейтральных натриевых солей.

Как показывает табл. I, наряду с многими неактивными веществами имеются некоторые, проявляющие большую активность и вызывающие максимальный сдвиг при концентрации 0,001 М и производящие действие даже при концентрации 0,0001 М. Среди наиболее активных веществ находятся динитрофенол и динитронафтол, которые нарушают сопряжение реакций при окислительном фосфорилировании. Тот факт, что оба действия имеют некоторую связь друг с другом, явствует из поведения дикумарола (№ 33 в таблице) и пентахлорофенола (№ 27), аналогичное биологическое действие которых также известно. Из за своей нерастворимости дикумарол не может быть исследован при концентрации, большей чем 0,0001 М. Исключение или замена фенольной гидроксигруппы, которая существенна для биологического действия, также лишает молекулу ее способности оказывать воздействие на родамин.

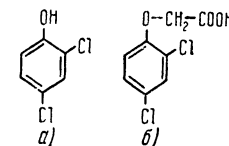


Рис. 9. а) 2,4-дихлорофенол; б) 2,4-дихлорофеноксикусусная кислота.

Стоит упомянуть о большом различии в активности двух химически близких веществ — 2,4-дихлорофенола и 2,4-дихлорофеноксикусусной кислоты (рис. 9). Оба вещества высокоактивны биологически, но их активность совершенно различна; поэтому было интересно обнаружить их различие также и в описанном простом эксперименте *in vitro* (см. параграфы 12 и 16). В эксперименте с родамином разница в действии 2,4-дихлорофенола и 2,4-дихлорофеноксикусусной кислоты (2,4 Д) может быть объяснена стерическими соотношениями.

Если построить атомную модель молекулы родамина, хлорофенола и нитрофенола, то можно увидеть, что активный нитрофенол и нитронафтол могут быть легко приведены в состояние, в котором фенольный гидроксид и одна NO₂-группа соприкасаются с двумя резонирующими атомами N красителя. То же самое имеет место и для карбо-

кисильного O^- и одного Cl (№ 4) в 2,4 Д, тогда как 2,4-дихлорофенол не может быть приведен в соприкосновение с двумя атомами N родамина своими группами OH и одним из своих атомов Cl .

Необходимо отметить также активность йодозамещенных фенола (№ 30, 31). Здесь, очевидно, активность связана с высоким атомным числом йода, а не с дипольным моментом молекулы, так как соответствующие соединения хлора, хотя и имеют больший дипольный момент, менее активны.

Более тяжелый заменитель хлора, например пентахлорофенол (№ 27), также делает молекулу более активной, о чем следует упомянуть в связи с инсектицидным действием веществ этой группы.

Родаминовые комплексы

При описанных экспериментах наблюдалась весьма интересная реакция родамина с нитро- и хлорофенолом. Если нитро- или хлорофенол добавить к кислому водному раствору родамина, то в нем произойдут поразительные изменения: оранжевая флуоресценция с максимумом при 578 $m\mu$ исчезает, и в растворе возникает сильное помутнение без изменения цвета.

Однако если смотреть сквозь раствор на источник света, то раствор будет казаться прозрачным и темно-синим. Эти изменения происходят вследствие образования коллоидально-дисперсных нерастворимых комплексов, которые постепенно, за время порядка одного дня, оседают на дно пробирки. Эти соединения — очевидно, «молекулярные комплексы» — были изучены Р. Стилом (не опубликовано). Он нашел, что для их образования необходимо наличие воды и недиссоциированных фенольных групп.

При подщелачивании раствора или при растворении комплексов в безводных растворителях вроде метанола и ацетона они быстро диссоциируют. У этой реакции имеется одна особенность, которая привлекает к ней интерес биологов, — ее замедленность. Образование комплексов, сопровождаемое понижением и сдвигом максимума абсорбции, может быть проследжено спектроскопически. Это иллюстрирует рис. 10 (заимствованный у Стила). Первые восемь

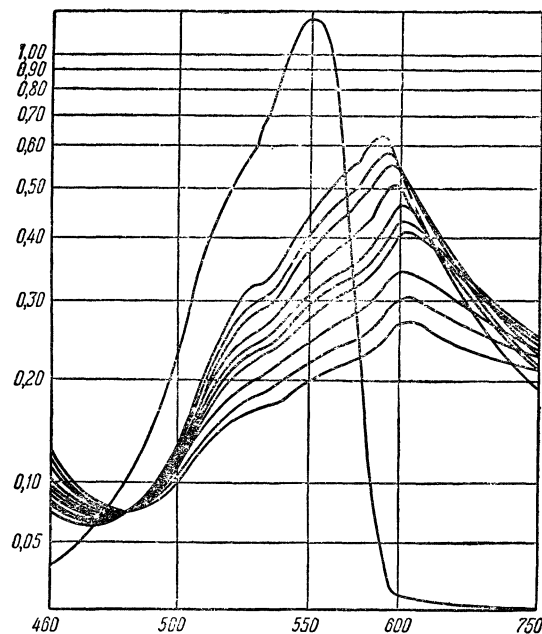


Рис. 10. Реакция между родамином В ($1,8 \cdot 10^{-5} M$) и 2,4-дихлорофенолом ($0,011 M$) при $pH = 5,9$ по спектроскопическим данным. По оси абсцисс отложена длина волны в $m\mu$, по оси ординат — экстинкция. Единичная высокая кривая в середине соответствует чистому родамину. (Дихлорофенол в чистом виде не имеет поглощения в этой области длин волн.) Семейство кривых было получено путем измерения абсорбции через различное время после смешивания обоих реагентов. Верхняя кривая справа была получена спустя 7 минут после смешивания. Последующие кривые — через 5, 10, 29, 59, 89, 120, 252 и 312 минут после этого. Первые восемь кривых проходят через изобестическую точку в левой части рисунка. Только две последние кривые слегка отклоняются от нее (на рисунке этого не видно), указывая, что в это время (но не ранее) седиментация уже начинает влиять на результат.

кривых проходят через изобестическую точку, показывая, что постепенное изменение обусловлено скоростью образования комплексов, а не их седиментацией, и реакция длится часами до завершения.

Для биолога эта замедленность интересна тем, что тироксин и трийодотиронин, которые образуют аналогичные комплексы с родамином, проявляют ту же замедленность. Известно, что для полного развития биологического действия тирокина необходимо 24—48 часов, и своего максимума оно может достичь на десятый день после приема.

ЧАСТЬ II

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ

«Исследовать — значит видеть то,
что видели все, и думать так, как
не думал никто».

9. ТЕОРИЯ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ

В этой части книги я предполагаю рассмотреть некоторые избранные биологические структуры и функции, чтобы выяснить, можем ли мы их лучше понимать или хотя бы видеть в новом свете, смотря сквозь призму E^* . Чтобы остаться верным своей традиции, я начну с мышцы.

Существует множество теорий мышечного сокращения. Сам автор ответствен за некоторые из них. Большинство из этих теорий было наголову разбито при столкновении физики, химии, физиологии и электронной микроскопии. Удовлетворяя лишь требованиям науки их автора, они оказывались несовместимыми с данными других наук. В настоящее время мышца находится в положении священного слона, имеющего девяносто девять имен, причем настоящим является лишь сотое, известное ему одному. Если наши неудачи в попытках понять мышцу проистекали из того, что ее функционирование включает E^* , то наши знания относительно E^* должны сами собой сплавиться со старыми знаниями в новую теорию сокращения. В этой теории важное место должно быть отведено тому факту, что образование водной структуры, которую, как предполагается, создают вокруг себя неполярные группы белков, происходит с сильным расширением, так как образованный лед имеет кубическую решетку и очень низкую плотность. Электрополярные группы миозина и таких связанных с миозином веществ, как АТФ, также вносят свою долю в образование водных структур.

Насколько нам известно, элементарный акт сокращения производится миозиновой «молекулой», состоящей из большого числа меньших единиц — «протомиозинов», связанных друг с другом не отдельными сильными ковалентными связями, а множеством более слабых связей (водородные

связи, ван-дер-ваальсовские или электрические притяжения). Такие связи в отличие от ковалентных не имеют фиксированных валентных углов. Это делает всю структуру похожей на нитку бус или связку таких ниток, наиболее характерным свойством которой является гибкость, податливость деформации. Можно ожидать, что силы, действующие между протомиозинами, не только удерживают эти частицы вместе, но также стремятся стянуть их из нитевидной в более компактную, округленную и укороченную форму (см. рис. 2). Если тем не менее мы находим миозиновую частицу вытянутой в прямую нить — все равно, будет ли это в растворе или в расслабленной мышце — то должны существовать силы, противодействующие взаимному притяжению, которое стремится укоротить частицу. Следовательно, проблема сокращения заключается не в том, что вызывает сокращение частиц, а в том, что удерживает их растянутыми в расслабленном состоянии или что растягивает их вновь после сокращения.

Возникает предположение, что миозиновую частицу удерживает в растянутом состоянии, противодействуя сокращающим силам, расширенная водная структура, которую частицы образуют вокруг себя; сокращение же происходит вследствие разрушения этой водной структуры с последующей перегруппировкой протомиозинов в укороченный агрегат. Последнее происходит за счет энергии АТФ. Для того чтобы произвести такое изменение, (E) молекулы АТФ должна быть преобразована в более мобильную E^* , которая может взаимодействовать с водной структурой.

В упрощенном виде предлагаемая теория сводится к следующему: частица миозина поддерживается в растянутом состоянии своей водной структурой. Сокращение вызывается разрушением этой структуры, восстановление же ее представляет релаксацию *). Возникает вопрос, насколько

*) Известно, что фибриллярная молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты, растворенная в воде, при добавлении солей сокращается примерно на 30%. При этом, как показал Джакобсон (применяя NaCl), разрушается структура воды. Возможно, что разрушение этой структуры и является ответственным за сокращение, делая процесс похожим на мышечное сокращение, как предполагает описываемая здесь теория.

ко эта теория согласуется с известными фактами о мышце или в какой степени она их объясняет.

Миозин в водном растворе имеет высокую вязкость. Это говорит о том, что его частицы находятся в растянутой, фибриллярной форме. Следовательно, чтобы удерживать их в таком виде, не требуется присутствия АТФ. На тесную взаимосвязь актомиозина с водой указывает сильная гидратация этого комплекса. Действительно, трудно приготовить раствор актомиозина, содержащий менее 97% воды. Высокая вязкость показывает, что частицы находятся в растянутой, фибриллярной форме. АТФ при физиологической солевой концентрации освобождает частицы коллоида от их гидратации и вызывает их сокращение. Сокращенный гель состоит из «сухого» актомиозина и некоторого количества воды, застрявшей между его частицами.

Можно ожидать, что тепло разрушает структурность воды и не только денатурирует актомиозин, но и вызывает его сокращение с развитием значительного натяжения, как это было показано Варга. Возможно, что спирт также денатурирует белки путем нарушения структурности воды, но не производит сокращения потому, что, удаляя воду, он делает систему слишком жесткой. Денатурирующее действие замораживания с последующим оттаиванием на миозин может также обуславливаться потерей гидратной воды, которая превращается в гексагональные кристаллы льда.

Эрнст обнаружил, что мышца при возбуждении уменьшается в объеме. Это «сокращение объема» следует непосредственно за возбуждением и предшествует сокращению. Сокращение является вторичным явлением по отношению к изменениям, вызывающим сокращение объема. Сокращение объема никогда не находило удовлетворительного объяснения, которое получило бы всеобщее признание. Наша теория требует такого сокращения объема, так как разрушение развившейся вокруг частиц миозина водной структуры должно вызывать изменение объема. Плотность как кубической, так и гексагональной водной структуры ниже плотности неупорядоченной воды.

Если частица миозина поддерживается в растянутом состоянии расширенной структурой воды, то возрастание давления должно способствовать сокращению, а сокращение

должно идти рука об руку с уменьшением молярного объема миозина. Это действительно так, как было показано Д. С. Броуном, который подсчитал также уменьшение молярного объема миозина и нашел его значительным. Сокращение мышцы, подвергнутой высоким давлениям, было известно давно как «явление Эббека».

Крупные ионы, такие, как I^- , SCN^- и NO_3^- , которые не могут включаться в решетку воды, препятствуют образованию этих решеток и, таким образом, противодействуют релаксации, удлиняя «активное состояние» мышцы, и, следовательно, увеличивают натяжение при сокращении. Это было показано Чао и последующими анализами его наблюдений, выполненными Каном и Сандоу, Хиллом и Макферсоном и Ричи. Было установлено, что действие этих ионов зависит от их положения в «ряду Гофмейстера», т. е. от их атомного радиуса. Так как эти ионы являются «тушителями», то их активность, возможно, обусловлена также воздействием на E^* .

Нет необходимости говорить, что функция мышцы заключается не просто в том, чтобы сокращаться, а в том, чтобы сокращаться именно тогда, когда это необходимо, причем сокращение должно происходить в течение миллисекунд, и мышца должна немедленно расслабляться, как только будет совершена работа. Соответственно в мышце мы находим, кроме миозина, также и триггерный механизм, в котором первостепенное значение имеет актин. Согласно данным моей лаборатории, мышца в расслабленном состоянии не содержит актомиозина, но содержит актин и миозин, находящиеся рядом и удерживаемые в раздельном виде очень тонким балансом сил притяжения и отталкивания со слабым преобладанием отталкивания. Эти силы отталкивания — электрические, и АТФ, связанный с миозином, играет в них важную роль своими четырьмя отрицательными зарядами. Равновесие сил на мгновение нарушается «возбуждением», после чего актин и миозин образуют актомиозин. В образовавшемся таким образом актомиозине отщепляется конечная $\sim P$ в АТФ, и ее энергия вводится в действие. При релаксации происходит рефосфорилирование АДФ в АТФ, который своими восстановленными четырьмя зарядами раздвигает актин и миозин, после чего свободные частицы миозина реконструируют свои водные

структуры и вновь вытягиваются в нить, приходя, таким образом, в готовность к новому сокращению.

Излагаемая теория находит поддержку в том факте, что до сих пор электронным микроскопом не было обнаружено какого бы то ни было складывания в сокращающихся актомиозиновых нитях. Единственное, что можно увидеть (как прекрасно показано на снимках, сделанных Спиро), — это утолщение. При высокой степени сокращения исчезает периодичность в картинах дифракции рентгеновских лучей, тогда как регулярное складывание должно было бы породить новые линии на рентгенограммах.

Предложенная теория может оказаться правильной или неправильной. Но во всяком случае она показывает, что на основании сказанного в этой книге могут быть созданы новые представления.

10. МОЛЕКУЛА АТФ*)

Первое, что бросается в глаза при рассмотрении общепринятой структурной формулы АТФ (рис. 11), — это большая ее сложность. Природа не позволяет себе роско-

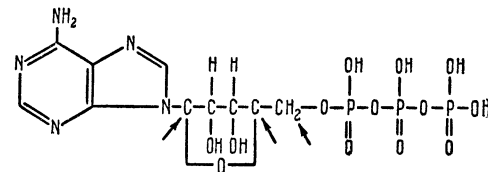


Рис. 11. Структурная формула молекулы АТФ.

ши, поэтому удивительно, что клетка применяет столь сложную молекулу, если ей нужна всего лишь связь $P-O-P$. То же самое мог бы дать и более простой неорганический полифосфат.

Молекула имеет два конца: фосфатный и пуриновый. Фосфатный конец представляет запас энергии (E); спраши-

*) Содержание этого параграфа было представлено на Международном симпозиуме по ферментам (Фордовский фонд, Детройт, 1—3 ноября 1955) и опубликовано в книге «Enzymes: Units of Biological Structure and Function». Редактор Oliver H. Gaebler, Academic Press, New York, 1956.

вается, не представляет ли пуриновый конец E^* , придавая таким образом молекуле существенные части, необходимые для перехода $(E) \rightarrow E^*$. Пурин содержит обширную систему сопряженных двойных связей с их нелокализованными π -электронами и пятью атомами N, каждый со своей уединенной парой электронов. Как будет указано ниже, в определенных условиях этот конец молекулы может стать сильно флуоресцирующим, что согласуется с нашим требованием к передатчику E^* . Таким образом, пурин, возможно, способствует переходу (E) связи $\sim P$ в E^* , когда эта энергия (E) должна вступить в биологическое действие и привести в движение живую машину. Следовательно, в целом молекула АТФ является не только аккумуляторной батареей, но и трансформатором энергии.

Структурная формула молекулы АТФ

Из рис. 11 не вполне ясно, каким образом энергия, воспринятая пуриновым концом, может быть передана фосфатному концу и обратно, так как они разделены пентозой, не имеющей ни сопряженных двойных связей ни π -электронов.

Но действительно ли структура молекулы АТФ такова? Не вводит ли нас в заблуждение зрительное впечатление, производимое структурной формулой, в правильности которой мы не сомневаемся лишь потому, что видели ее слишком часто *)? Молекула АТФ имеет одну связь C—N, одну связь C—C и одну связь C—O (отмеченные на рис. 11 стрелками), которые допускают свободное вращение, в результате чего молекула имеет ограниченную свободу изменять

*) Хлорофилл, возможно, также представляет пример подобного влияния наглядной картины, мешающего нам мыслить в определенных направлениях. Связь между хлорофиллом и каротинами искали длительное время без определенных результатов.

На рис. 12, *а* представлена Mg-порфириновая часть хлорофилла, тогда как на рис. 13, *а* приведена цепь бета-каротина. Обе структуры как будто не имеют связи друг с другом: первая состоит из пиррольных колец, координированных металлом, тогда как вторая построена из изопренов. Однако, если мы исключим магний с четырьмя атомами N, а также более длинные боковые цепи порфирина, мы получим цепь (рис. 12, *б*), которая почти идентична свернутой цепи каротина (рис. 13, *б*). Если эти связи до сих пор не рассматривались, то, возможно, лишь потому, что мы слишком часто видели структурную формулу пиррола.

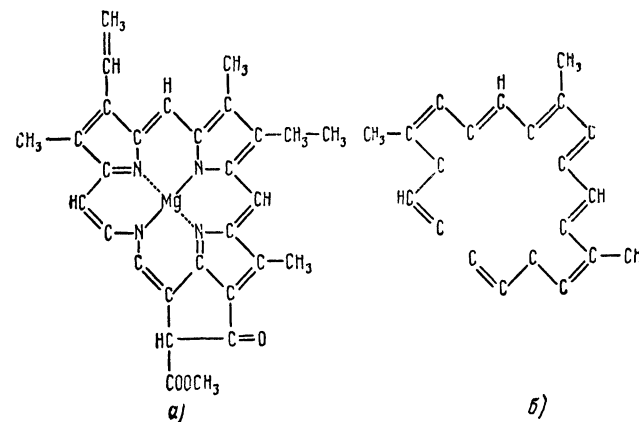


Рис. 12. а) Mg-порфириновая часть хлорофилла без фитольной боковой цепи; б) то же, что и а), с исключенными Mg и более длинными боковыми цепями.

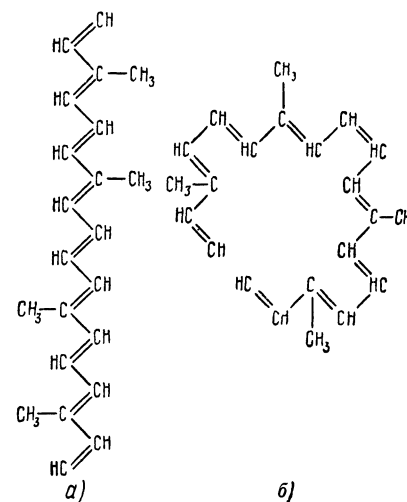


Рис. 13. а) Центральная цепь каротина без иононовых колец; б) то же самое в свернутом виде.

свою форму и сворачиваться. В действительности растянутая линейная форма молекулы, показанная на рис. 11, маловероятна, и остается открытой возможность того, что путем поворотов и последующих складываний фосфатный и пуриновый концы молекулы могут сблизиться друг с другом. Конечно, простого «сближения» еще недостаточно для переноса энергии между двумя концами, так как энергия $\sim P$, которая должна быть передана, есть (E), т. е. энергия связи, не производящая внешнего действия. Для переноса (E) должно иметь место тесное соответствие, точка в точку. Атомы, которые должны соприкоснуться друг с другом, — это два атома О диссоциированной группы ОН фосфатной цепи и два атома N пуриновой группы. Два атома О — это атомы, лежащие по обе стороны конечного $\sim P$, который должен отщепиться и отдать свою энергию (E), тогда как два атома N пурина — это, по всей вероятности, атом N группы NH_2 в положении 6 (потому что этот атом N как будто принимает наибольшее участие в реакциях, происходящих при сокращении мышцы) и его сосед в положении 7.

Однако свободное вращение не означает свободного движения. Связь С—С не разрешает молекуле сгибаться любым произвольным образом, так как валентные углы должны оставаться постоянными. Движение не более свободно, чем относительное движение двух колес, сидящих на одной оси. Даже при трех вращающихся связях свобода молекулы АТФ весьма ограничена, и статистически весьма маловероятно, что NH_2 и N_7 встретятся с двумя атомами O^- , полностью соответствуя друг другу. Таким образом, если эти четыре атома могут встретиться, полностью соответствуя друг другу, то это, очевидно, не простая случайность, а событие, имеющее функциональное значение, и молекула АТФ *создана такой, а не случайно такова*. Насколько возможна такая встреча, можно решить, построив атомную модель, в которой соблюдены атомные радиусы и ограничения свободы, жесткость и малая сгибаемость углов связи. Такой является атомная модель Курто. На рис. 14 показана построенная из этой модели молекула АТФ в своей общепринятой линейной форме, соответствующей рис. 11. (Молекула здесь представлена в диссоциированной форме с O^- вместо ОН на фосфате.)

Если эту молекулу вращать вокруг связей С—С, С—N и С—О, то фосфатный конец может перегинуться назад,

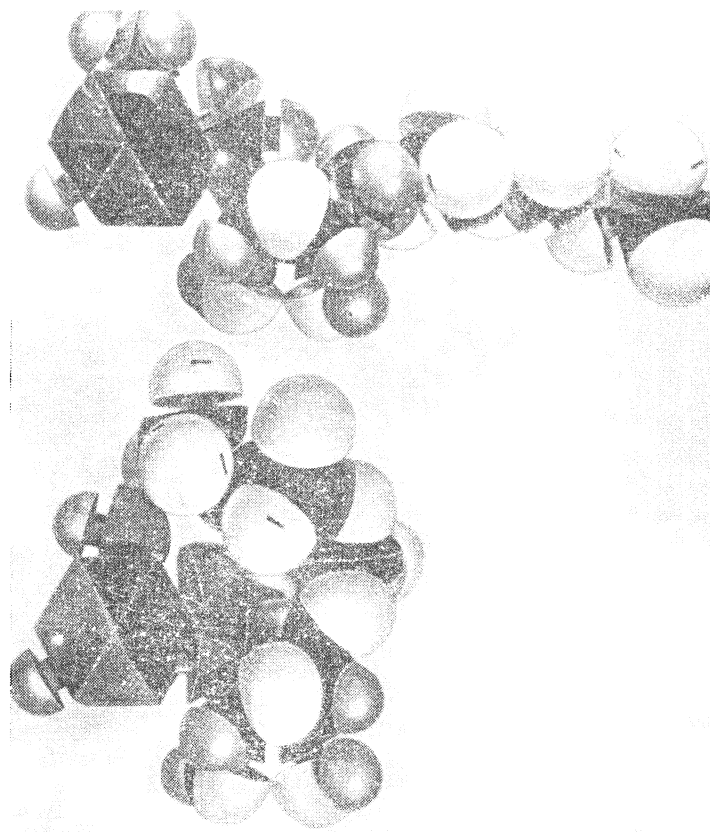


Рис. 14. (Наверху) Молекула АТФ, изображенная на рис. 11, построенная из атомной модели Курто.

Рис. 15. (Внизу) То же, что на рис. 12, в сложенном виде.

так что атомы O^- конечного и среднего фосфата как раз соприкоснутся с упомянутыми атомами N. Это показано на рис. 15. Если между O^- и N возникает какая-либо связь,

то связь $P-O-P$, которая должна расщепиться при сокращении мышцы и дать для него энергию, образует кольцо с пурином. Конечно, для того чтобы энергия перешла от фосфата к пурину, контакт между ними должен быть тесным. Он может осуществляться водородными мостами, возможно образующимися между O и N , так как согласно Гергели и Эвансу, водородные связи могут установить взаимоотношения, при которых перекрываются π -орбиты. Таким образом, возможно, что молекула АТФ, активированная миозином, соединит свои два конца, тем самым

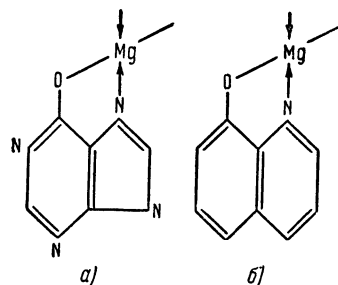


Рис. 16. а) Mg-комплекс оксипурина; б) Mg-комплекс оксихинолина.

открывая путь переносу энергии от одного к другому. Это, однако, не объясняет роли двухвалентных ионов Ca и Mg , каждый из которых ускоряет АТФ-азную активность миозина. Возможное решение этой проблемы подсказало случайное наблюдение. Как указывалось в § 4, мы можем ожидать, что передатчик энергии будет флуоресцирующим. Так как при сокращении происходят очень сильные изменения энергии, то автор ожидал найти в мышце высокой концентрации флуоресцирующий передатчик энергии; для этого он приготовил спиртовые экстракты мышцы, ожидая, что они будут сильно флуоресцировать под действием ультрафиолетовой лампы. Экстракты не флуоресцировали. Однако при добавлении к ним двухвалентных металлов — Mg , Ca или Zn (в виде хлоридов) — возникла интенсивная голубая флуоресценция. Флуоресцирующее вещество было выделено и идентифицировано Мак-Лафлином, Шифманом и автором и оказалось металлическим комплексом инозиндифосфата (ИДФ), вещества, возникающего из АТФ при потере им конечного фосфата и его гидролитической деаминации.

Вероятная структура металлического комплекса была выяснена на основе близкой аналогии инозина с оксихинолином (рис. 16, а и б). Известно, что последний образует с Mg в спиртовом растворе очень стабильный, сильно флюо-

открывая путь переносу энергии от одного к другому.

Это, однако, не объясняет роли двухвалентных ионов Ca и Mg , каждый из которых ускоряет АТФ-азную активность миозина. Возможное решение этой проблемы подсказало случайное наблюдение. Как указывалось в § 4, мы можем ожидать, что передатчик энергии будет флуоресцирующим. Так как при сокращении происходят очень силь-

респирующий хелат. Очевидно, аналогичный хелат образуется и с инозином (рис. 16, а).

Известно, что Mg и Ca образуют очень стабильные координированные комплексы с полифосфатами. Возможно, что эти металлы создают своими четырьмя координационными валентностями счетверенные хелаты, соединяя два конца молекулы АТФ. Эта структура показана на рис. 17.

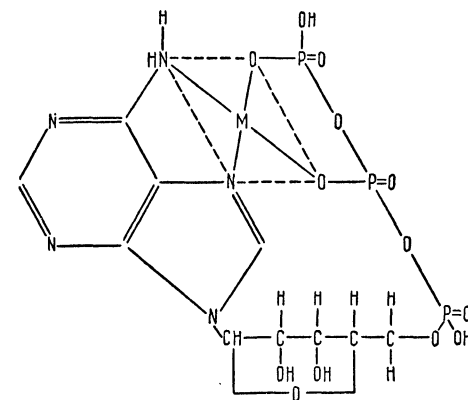


Рис. 17. Возможная структура Mg-комплекса АТФ (межатомные расстояния произвольные).

Модель на рис. 15 показывает, что для Mg имеется как раз достаточно места между двумя атомами N и двумя атомами O . Стрелки на рис. 16 указывают, что металл притягивает электроны из хинолина (Леверенц). Можно ожидать, что то же самое происходит и с комплексом инозина и, если металл образует счетверенный хелат, связываясь также с фосфатами, он может притягивать электроны и из них. Таким образом, металл может служить мостом, через который электроны перемещаются от фосфата к пурину. Следовательно, Mg не только соединяет два конца молекулы, но и создает единую электронную систему фосфатных цепей и пуринов с общими нелокализованными электронами, которые могут переносить энергию, причем пурины имеют свою систему сопряженных двойных связей, а фосфаты содержат атомы O с их несвязанными уединенными парами электронов. Таким образом, группа $P-O-P$, несущая в

себе запас (E), может слиться с аденином в одну обширную систему мобильных электронов.

Это создает возможность того, что при образовании такого сдвоенного хелата и притяжении металлом электронов фосфата энергия и сила связи $P-O-P$ снижаются, в результате чего связь оказывается жертвой гидролитического расщепления, а ее энергия передается пуриновому кольцу в виде E^* , завершая переход (E) — E^* .

То, что Mg действительно может облегчить переход электрона с одного вещества на другое, с которым этот металл образует комплексы, можно

показать смещением спиртовых растворов 1,2-нафтохинона и *o*-фенилендиамина (рис. 18). В этой системе хинон очень медленно окисляет диамин, получая от него электроны. Наличие ионов Mg сильно ускоряет эту реакцию, так же как и в случае с АТФ-азной активностью миозина, которая существует и без магния, но сильно ускоряется этим металлом. За реакцией между хиноном и диамином можно следить по потемнению раствора (реакцию легко можно

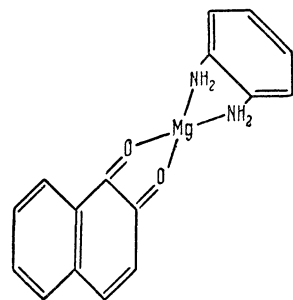


Рис. 18. Mg -хелат *o*-фенилендиамина и нафтохинона.

обратить с помощью таких восстановительных агентов, как аскорбиновая кислота).

Одной из привлекательных сторон изложенной теории АТФ-азной активности является то, что она аналогична теории Е. Л. Смита о пептидазной активности.

Против этой теории можно выставить серьезные возражения: константа равновесия металлического хелата Mg с аденином или инозином в воде очень низка; энергия этой связи недостаточна для удержания вместе всего учетверенного хелата вопреки силам теплового возмущения. Mg -фосфатный комплекс очень стабилен, и, следовательно, мы можем ожидать, что АТФ находится в мышце в виде комплекса с Mg ; в мышце магния в два раза больше, чем АТФ, но можно ожидать, что связи, образуемые им с аденином или пурином, рвутся в воде. Наша модель на рис. 15 говорит лишь о том, что такой комплекс *мог бы образоваться*, а не то,

что он действительно *образуется*. Однако мы должны помнить о том, что при расщеплении в мышце АТФ не свободен, а связан с белком — миозином — и «активирован» им. Мы не знаем, что означает «активация». Вероятно, она заключается в связывании субстрата и последующей его деформации. Таким образом, возможно, что миозин удерживает молекулу АТФ в положении, необходимом для образования моста между фосфатом и пурином, и именно в этом заключается то, что мы подразумеваем под активацией. В качестве аргумента можно привести еще и то, что если бы константа равновесия у пуринового комплекса была достаточно высока для того, чтобы соединить два конца молекулы вместе и сделать возможными передачу энергии и расщепление $\sim P$, то эта реакция была бы бесполезна для мышцы, так как тогда связь $\sim P$ расщеплялась бы самопроизвольно и ее энергия бессмысленно рассеивалась бы. Один из основных принципов природы — не применять самопроизвольных реакций, которые происходят сами по себе и не поддаются управлению. Если бы энергетика клетки основывалась на самопроизвольных спонтанных реакциях, то весь механизм срабатывал бы бесполезно, как часы без маятника. Любая теория АТФ-азной активности должна удовлетворять тому требованию, что расщепление $\sim P$ должно происходить лишь в молекулах АТФ, связанных и активированных миозином, когда энергия $\sim P$ может быть передана белку и израсходована с пользой. Именно низкая константа равновесия гипотетического Mg -пуринового комплекса и делает эту теорию приемлемой.

Несколько слов можно сказать о третьем члене молекулы АТФ — пентозе, соединяющей аденин с фосфатом таким образом, что они подходят друг к другу именно в правильном положении. Гексоза не пригодна для этого. Но это не все. Природа часто убивает одним выстрелом более чем одного зайца. В связи с этим стоит упомянуть о том, что Бюро патентов США выдало два патента на упрочение желатина пентозой, чего не производит гексоза *).

*) Патент США № 2059817 (3 ноября 1956 г.) и патент № 2180335 (21 ноября 1939 г.). Первый выдан Eastman Kodak Co., Jersey City, N. J. второй — Agfa Ansco Corporation, Binghamton, New York.

с белком, играющую, весьма возможно, важную роль в «активации» АТФ.

Еще одно замечание может быть сделано относительно Са. Кальций сильно повышает АТФ-азную активность, в тоже время не способствуя сокращению и аналогичным реакциям, таким, как «супер-преципитации», и даже подавляя их. Одно из возможных объяснений этого заключается в том, что Са, аналогично Mg, образует хелаты и ослабляет $\sim P$, но не может передать его энергию пурину из-за большого различия энергетических уровней Са и N. Соответственно, Са также не способствует окислительно-восстановительной реакции между 1,2-нафтохиноном и *o*-фенилендиамином.

В § 12 мы еще раз вернемся к вопросу о возможной дополнительной роли пентозы.

Уже при чтении корректуры этой книги мое внимание привлекла статья Левендала и Джеймса (Biochim. et Biophys. Acta 21, 298, 1956). Вывод их может быть приведен без комментариев: «Была определена ротационная дисперсия аденина, аденозина, АМФ, АДФ и АТФ. Данные были интерпретированы в предположении, что молекула АТФ складывается назад сама на себя таким образом, что становится возможным связывание двух последних фосфатных групп с аминогруппой аденина. Эта стабилизированная структура считается необходимой для функционирования АТФ. С помощью аналогичной конфигурации может быть объяснено «АТФ-подобное» действие СТФ, ИТФ и других трифосфонуклеотидов».

11. РИБОФЛАВИН

Общеизвестно, что функция рибофлавин-5'-фосфата (который я сокращенно буду называть «рибофлавином») заключается в том, что он действует в качестве промежуточного Н-акцептора в окислительной системе, захватывая атомы Н, идущие от пищевых продуктов, и передавая электроны в цитохромную систему. Эта функция находится в соответствии с его химией. Воспринимая атомы Н попарно и выдавая электроны по одному, он должен быть способен образовывать свободные радикалы. Эту способность можно легко продемонстрировать, восстанавливая его в сильно кис-

лой среде. причем зеленовато-желтый цвет окисленной формы превращается в красно-коричневый цвет свободных радикалов.

В действительности функция рибофлавина заключается не просто в том, что он служит мостом для Н или для электронов, а в запасании высвобожденной при окислительном восстановлении энергии в связях $\sim P$. В данном случае наша проблема заключается в установлении того, принимает ли в этом процессе участие E^* .

Как было установлено выше, наличие флуоресценции указывает на то, что молекула скупко рассеивает энергию

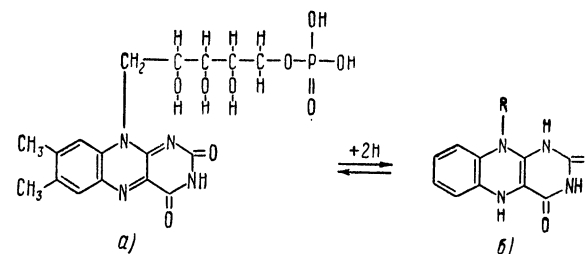


Рис. 19. а) Структурная формула окисленного рибофлавин-5'-фосфата; б) то же для восстановленной формулы.

своего возбуждения E^* и, следовательно, может служить передатчиком энергии. К тому же было установлено, что все флуоресцирующие молекулы во льду способны переходить в триплетное состояние. Хорошо известная яркая зеленовато-желтая флуоресценция рибофлавина может, следовательно, дать нам смелость идти по этому пути.

Структура рибофлавина (рис. 19) имеет много общего со структурой АТФ. Мы видели, что структура АТФ сложнее, чем это необходимо, если считать, что его функция ограничивается ролью фосфатоносителя. Структура рибофлавина также значительно сложнее, чем это требуется для промежуточного Н-акцептора. Молекула АТФ построена из трех частей: из фосфата на одном конце, гетероциклического соединения с обширной системой сопряженных двойных связей на другом и соединяющей их пентозы. Рибофлавин имеет аналогичную структуру с фосфатом на одном конце,

изоаллоксазином вместо пурина на другом и рибозой, вместо рибофуранозы, посередине. Однако функция рибофлавина в некоторой степени противоположна функции АТФ. Тогда как функция АТФ заключается в целесообразном использовании (E) связей $\sim P$, функция рибофлавина заключается в том, что он принимает участие в окислительном фосфорилировании и стабилизирует высвобождаемую энергию, запасая ее в связях $\sim P$. АТФ получает фосфат от других фосфатных акцепторов в виде трифосфатной цепи, затем разрывает эту цепь, превращая в пурине, как мы предполагали, ее (E) в E^* . Таким образом, предлагаемая гипотеза заключается в том, что рибофлавин может вести этот же процесс в противоположном направлении, преобразуя E^* , генерированную окислительным восстановлением его аллоксазина, в энергию связи $\sim P$ путем создания на противоположном конце трифосфатной цепи, фосфаты которой он затем передает другим фосфатным акцепторам, оставляя себе лишь один.

Что касается механизма этих реакций, то мы предполагаем, что АТФ (на ферменте) соединяет свои два конца, образуя координированный металлический комплекс между активными группами своего пурина и трифосфатным концом. Таким образом, первым вопросом, возникающим при изучении АТФ, является вопрос о стерической возможности образования такого комплекса. Если существует предполагаемая аналогия между АТФ и рибофлавином, то можно также поставить вопрос о стерической возможности противоположного процесса, т. е. о том, может ли аллоксазин связать в виде металлического комплекса два фосфата, затем сдвинуть их вместе и присоединить к своему собственному фосфату с помощью E^* , генерированной окислительно-восстановительным процессом в его аллоксазиновой группе. Чтобы сделать это, аллоксазин должен иметь три активные группы в близком соседстве. Такие три группы он имеет: $C=O$ в положении 2, NH в положении 3 и другую группу $C=O$ в положении 4 (рис. 19). Вопрос таким образом, заключается в следующем: возможно ли стерически привести гипотетический трифосфат, образованный на фуранозе, в положение, при котором один атом O каждого из трех фосфатов соприкасается с одной из трех активных групп аллоксазина?

Ответ на это дает рис. 20, на котором представлена модель аллоксазин-трифосфата, построенная с помощью атомной модели Курто. Три атома, отмеченные одинарными стрелками, — это атомы O трех фосфатов, тогда как три стрелки

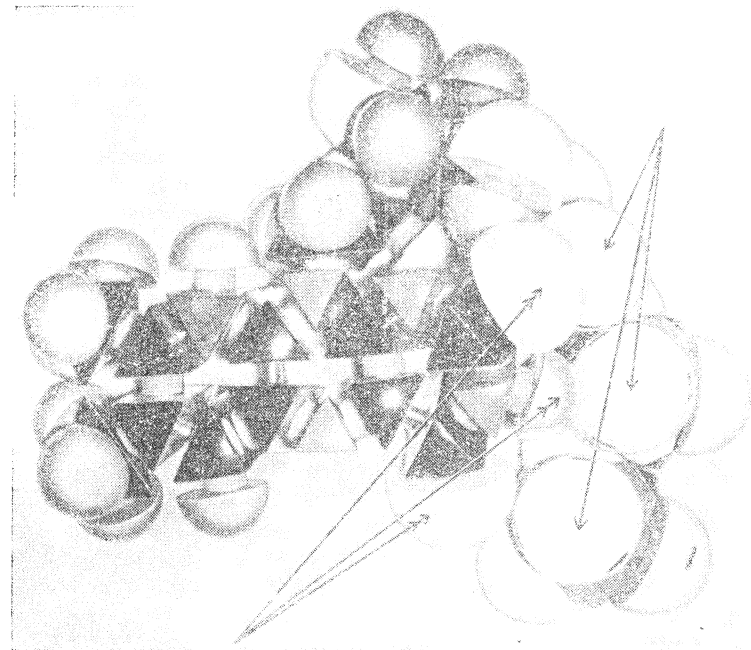


Рис. 20. Гипотетический сложенный трифосфат рибофлавина, построенный с помощью атомной модели Курто. Объяснение см. в тексте.

с двойным оперением указывают на связи $=O$, NH и $=O$ аллоксазина. Они тесно соприкасаются. Если в АТФ статистически образование комплекса весьма маловероятно, то здесь оно еще менее вероятно, и, следовательно, мы можем сказать, что структура наводит на предположение, что рибофлавин не случайно обладает способностью образовывать комплексы, а создан именно таким. Мы можем также добавить, что любое изменение в рибофлавине, как, например, замена рибозы рибофуранозой или иное расположение

О и NH в изоаллоксазине, делает образование таких комплексов невозможным. Таким образом, стала возможной функциональная интерпретация структуры молекулы рибофлавина. Группы CH_3 в положениях 6 и 7 могут действовать в качестве доноров электронов, резонируя с группами СО и NH. Можно ожидать, что для выполнения этой функции они могут быть расположены на противоположных концах молекулы, как это на самом деле и имеет место.

Раз образование трифосфата структурно возможно, следует поставить вопрос об энергетической возможности его возникновения. В этом отношении нам указывают путь спектральные свойства рибофлавина. Рибофлавин имеет три полосы поглощения при 260, 375 и 445 мμ. Когда молекула возбуждается ультрафиолетовыми лучами, ее электроны поднимаются на уровень соответствующей абсорбционной полосы и затем в результате «внутренней конверсии» переходят на низший синглетный уровень, высвечивая отсюда хорошо известную зеленовато-желтую флуоресценцию с максимумом полосы излучения при 540 мμ ($S_1 \rightarrow G$ на рис. 5). Для возбуждения электронов до уровня в 540 мμ необходима энергия в 64 калории, которая вряд ли имеется. Как было показано ранее, в воде возбужденные молекулы рибофлавина переходят в триплетное состояние, излучение с которого имеет максимум при 605 мμ, что соответствует энергии в 47 калорий; это несколько ближе к биологическому значению и все же еще слишком велико. Однако мы не должны забывать, что рибофлавин выполняет свою роль в клетке, будучи «активирован» белком, и мы не знаем, насколько эта связь с белком смещает энергетические соотношения. Мы знаем лишь, что они изменяются, так как рибофлавин, связанный со своим белком, утрачивает свою флуоресценцию, что может означать его переход в триплет, и длина волны его абсорбции увеличивается на 20 мμ, а это означает, что для его возбуждения требуется меньше энергии. Насколько меняются значения энергии, необходимые для триплетного возбуждения, нам неизвестно. Возможно, что это снижение еще более значительно.

Вернемся вновь к экспериментам с замороженными водными растворами; рибофлавин, замороженный в пробирке, при возбуждении почти полностью переходит в триплетное состояние. При этом цвет пробирки не меняется, как

это наблюдалось при дневном свете. Это означает, что абсорбция света в рибофлавине обусловлена синглетным возбуждением и потому, если даже триплет и образуется, то только путем перехода из синглета в триплет, как изображено стрелкой $S_1 \rightarrow T_1$ на рис. 5. Пробирка с добавкой KI имеет резко выраженный коричневатый оттенок, который даже лучше наблюдается при извлечении пробирки из замораживающей смеси и некотором ее прогревании *). Это указывает на то, что при наличии йодида становится возможным непосредственный переход в триплетное состояние — факт, весьма интересный для биолога, так как йод, в форме тироидных гормонов является одним из главных регуляторов метаболизма и его действие на E^* не зависит от его заряда или связи. Йод не единственное вещество, обладающее этим действием. Значительно сильнее производит его серотонин, действие которого заметно даже при концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М. Два обстоятельства делают этот эффект особенно примечательным. Первое — то, что серотонин входит в состав нормальных тканей, обладает сильной биологической активностью и с ним связаны различные патологические состояния, такие, как гипертензия и шизофрения (Вулли и Шоу). Второе — это то, что серотонин является индольным производным и тесно связан с растительными гормонами роста. Производные индола являются, по-видимому, одним из наиболее мощных инструментов живой природы, и поэтому механизм их действия представляет одну из наиболее важных проблем биохимии. Изменение цвета рибофлавина указывает на то, что эти производные способствуют непосредственному переходу с основного уровня в триплет. По-видимому, серотонин способен в некоторой степени производить такое действие даже и в замороженном водном растворе, в отсутствии структуры; 10^{-3} М серотонина, добавленного к раствору рибофлавина, порождает коричневый оттенок окраски. Спектрофотометрическое исследование показывает, что это изменение обусловлено возникновением плеча в спектре абсорбции рибофлавина, которое, судя по его положению, соответствует триплету.

*) При замораживании сначала замерзают и дают трещины на ружные слои, что затрудняет наблюдение за содержимым пробирки. При прогревании происходит обратное.

Серотонин не единственное вещество, производящее такие изменения. Аналогично, хотя и несколько слабее, действует лизергиновая кислота, а также 1-бензил-2,5-диметилбуфотенин и 1-бензил-2,5-диметилреотонин *). За любезное предоставление этих двух веществ я глубоко обязан д-ру Д. В. Вулли. Эти вещества как бы увеличивают вероятность прямого перехода с основного уровня в триплет, а также увеличивают стабильность этого триплета, что показано тушением фосфоресценции замерзшего раствора рибофлавина в присутствии O_2 . При концентрации рибофлавина в растворе, равной $10^{-4} M$, это свечение полностью тушится серотонином в концентрации $2 \cdot 10^{-5} M$ или лизергиновой кислотой. Следовало бы выяснить более детальным изучением, которого эти вещества безусловно заслуживают, ограничено ли действие этих веществ на E^* рибофлавином или оно представляет общую способность изменять вероятности синглет-триплетных переходов в пользу триплета.

12. ИОНЫ, ГЛЮТАТИОН, САХАРА И СПИРТЫ

Для опровержения теории E^* достаточно одного эксперимента, но лишь накопление большого количества фактов может сделать эту теорию приемлемой. Она может пробить себе дорогу, представив старые проблемы в новом свете или дав возможные ответы на вопросы, не получившие до сих пор удовлетворительного или вообще какого-либо ответа. Такие вопросы могут быть поставлены относительно роли ионов и glutathione.

Ионы

Основным внутриклеточным одновалентным катионом является K^+ , тогда как ионы Na^+ по возможности удерживаются клеткой во внешней среде, и одним из важнейших и основных вопросов общей биологии является следующий: почему это так? Басвелл и Роденбуш установили, что ионы K^+ хорошо подходят к пустотам кубической водной решетки, возникающей возле неполярных групп, тогда как ионы, большие чем K^+ , к ним не подходят. Ионы K^+ подходят также

*) Тожественность этого действия удивительна, так как Вулли и Шоу установили антагонизм этих веществ по отношению к серотонину Позже (1955), однако, Шоу и Вулли нашли также тождественность в биологическом действии.

к пустотам дефективной гексагональной кристаллической решетки. Их размеры очень близки к размерам молекул воды. Поэтому мы можем ожидать, что ионы K^+ не вызывают нарушения кристаллической регулярности, тогда как другие ионы, большие чем K^+ , нарушают ее. В соответствии со сказанным в этой книге кристаллическая регулярность воды имеет первостепенное значение для жизни клетки, так как триплетные возбужденные состояния могут нормально возникать лишь в невозмущенной, упорядоченной системе. Ион Na^+ в некотором смысле больше, чем ион K^+ , так как его ядро в меньшей степени экранировано электронной оболочкой; вследствие этого внешние силы не сбалансированы, и это приводит к образованию большей гидратной оболочки. Можно ожидать, что ионы Na^+ вызывают нарушения, а если это так, то и процессы возбуждения в их присутствии должны быть нарушены, и мы можем понять почему клетка по возможности удерживает ионы Na^+ во внешней среде, делая своим основным внутриклеточным катионом ионы K^+ .

Красители, дающие излучение с метастабильного уровня, являются индикатором для обнаружения нарушений водной структуры, и наша задача заключается в том, чтобы с их помощью показать, что Na действительно вызывает такое нарушение, которое было бы несовместимо с жизнью, если только E^* играет в ней основную роль и зависит от упорядоченности воды в клетке. Различные красители имеют разную чувствительность к нарушениям этой упорядоченности, что проявляется в различной длительности времени жизни их возбужденного состояния. Большее время жизни указывает на большую стабильность и, следовательно, на меньшую чувствительность. Рибофлавин имеет короткое время жизни, порядка 10^{-3} сек., и, следовательно, наиболее чувствителен. Время жизни несколько длиннее у родамина В и имеет наибольшую величину у акридин-оранжа.

В целом возбужденные состояния менее чувствительны к свойствам анионов, чем к свойствам присутствующих катионов. Так, поведение родамина при возбуждении лишь в слабой степени зависит от природы анионов в среде и определяется в основном присутствующим в ней катионом *).

*) Различие в воздействии различных галогенов может быть продемонстрировано на более чувствительных красителях, вроде рибофлавина, поведение которого различно в присутствии KF , KCl , KBr и KI .

Поведение возбужденного родамина в присутствии различных концентраций NaCl, KCl, RbCl и CsCl показано на рис. 21. По ординате отложены значения интенсивности фосфоресценции раствора в произвольной шкале при визуальном наблюдении. Замерзший водный раствор родамина (10^{-4} M) обладает слабым излучением, и возмущение проявляется в тушении или усилении этой фосфоресценции.

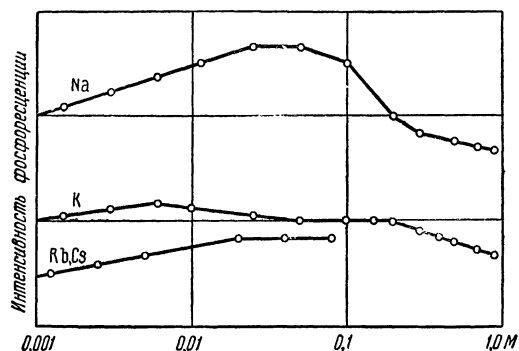


Рис. 21. Излучение света замерзшим водным раствором родамина (10^{-4} M) в присутствии NaCl, KCl, RbCl и CsCl в различных концентрациях.

Как показывает средняя кривая, KCl вплоть до предела его физиологической концентрации (0,16 M) не производит заметного возмущения и тушит свечение лишь при более высоких концентрациях. При очень низкой концентрации, ниже 10^{-2} M, видно слабое усиление излучения, которое, если судить по результатам, полученным с рибофлавином, может быть обусловлено анионами Cl. В отличие от этого Na^+ производит сильное возмущение. Разницу между Na^+ и K^+ можно наиболее убедительно продемонстрировать, держа рядом под ультрафиолетовой лампой три пробирки с замерзшим раствором родамина: одна вместе с красителем содержит 0,1 M NaCl, вторая — 0,1 M KCl, третья — без соли. В двух последних флуоресценция почти отсутствует, тогда как пробирка с NaCl обладает при температуре нашей замораживающей смеси интенсивным красным свечением. Такое резкое различие двух близких ионов, действительно, производит сильное впечатление.

Гидратная оболочка Li^+ еще больше, чем у Na^+ , так что разупорядочение и нарушения, вносимые этим ионом, еще значительнее. Для биолога действия Li^+ не менее интересны, чем действия Na^+ , ввиду обнаруженного Хербстом факта, что он индуцирует уродства в развивающемся эмбрионе, подвергнутом на ранних стадиях действию относительно низких концентраций ионов Li^+ . Большее нарушение порядка литием проявляется и в более сильном тушении фосфоресценции родамина. Так как излучение родамина (в отсутствие солей) достаточно слабо, то на нем это действие не особенно заметно. Для демонстрации различия между Li^+ и Na^+ лучше применить менее чувствительный краситель, например акридин-оранж. Если LiCl, NaCl и KCl в 0,1 M концентрации добавить к водному раствору (10^{-4} M) акридин-оранжа, полученные растворы заморозить в пробирках и подвергнуть их ультрафиолетовому облучению, то в первом из них, содержащем LiCl, будет наблюдаться интенсивное красное свечение, тогда как другие практически не будут светиться. Нарушения, производимые в развивающемся эмбрионе, можно объяснить нарушением водной структуры, которая, возможно, способствует расшифровке и передаче информации, содержащейся в генах.

Размеры иона аммония близки к размерам K^+ . Соответственно было найдено, что NH_4Cl , так же как KCl, не вносит изменений в люминесцентные свойства родамина.

Г л ю т а т и о н

Глютацион, присутствующий, согласно Ф. Г. Хопкинсу, в нормальных тканях в высоких концентрациях, достигающих одного миллимоля, является одним из самых удивительных компонентов клетки. Хотя были описаны различные интересные реакции глютациона, но его действительное биологическое значение пока не выяснено. Предполагается, что он действует, как редоксибуфер, поддерживая своими SH-группами SH-группы белков в восстановленном состоянии. Это, однако, всего лишь замещает одну проблему другой, а не дает ее действительного разрешения, так как в таком случае мы можем поставить вопрос: какова же роль групп SH в белке? В его функциях они, конечно, играют весьма важную роль. Многие ферменты

являются «SH-ферментами», и их активность полностью обусловлена интактностью этих групп. Имеются даже S-содержащие гормоны (окситоцин, вазопрессин, инсулин), которые в восстановленной форме могут усиливать свое действие. Следовательно, мы стоим здесь перед более широкой проблемой биологического значения серы вообще.

Исследования влияния глутатиона на возбуждение родамина методами, описанными выше, не дают ключа к проблеме. Глутатион, добавленный к раствору этого красителя, производит такое же действие, как и тиамин, — он усиливает фосфоресценцию. Это действие не специфично и в основном является функцией молярной концентрации.

Одним из параметров возбужденного состояния, который может иметь большое биологическое значение, является время его жизни. Время жизни триплетного состояния родамина мало, порядка 10^{-2} — 10^{-3} сек. Было испытано большое количество веществ в отношении их способности удлинять время жизни, но безрезультатно. Удалось найти только два вещества, способных при низкой концентрации существенно (до значений порядка секунд) удлинять время жизни этих состояний, — глутатион и пиридоксин. В растворах родамина, содержащих 0,01 M глутатиона, интенсивное красное послесвечение наблюдалось в медленном фосфороскопе; его можно было видеть и после внезапного прекращения освещения. При концентрации 10^{-3} M эффект был несколько слабее. Молекулярный кислород производил лишь небольшое тушащее действие, поэтому можно думать, что при низких концентрациях O_2 в тканях он не влияет на долгоживущее возбуждение.

Предположение о том, что удлинение времени жизни действительно обусловлено SH-группой, подтверждается тем, что глутатион теряет активность при окислении этой группы и что тот же эффект производит цистеин, но не цистин. В действии цистеина и глутатиона имеется лишь одно различие: тогда как первый действует лишь в кислых растворах (растворенный как цистин-HCl) и неактивен при нейтральной реакции, зависимость глутатиона от pH носит противоположный характер: он активен при нейтральной, но не при кислой реакции. Цистеин-этил-эфир оказался неактивным. Это говорит о том, что действие SH-группы каким-то образом зависит от структуры всей молекулы

в целом, включая группу COOH и продукты ее диссоциации. Возможно, что природа встроила цистеин в трипептиды и породила глутатион для того, чтобы сделать вещество более растворимым и дать возможность SH-группам совершать их работу при физиологической нейтральной реакции.

Время жизни триплетного возбуждения изменяется в широких пределах. Родамин имеет малое время жизни, хинидин и акридин-оранж — большее. Чем длиннее первоначальное время жизни, тем легче его удлинить до порядка 0,1 или 1 сек. Соответственно было найдено, что, тогда как в родамине этого эффекта можно достичь лишь с тремя веществами, с двумя другими веществами его производило большее число известных или неизвестных составляющих клетки. Экстракты ткани дают возможность наблюдать долгоживущее возбуждение хинидина даже при очень высоком разведении.

Из всего этого мы можем сделать одно заключение для наших последующих экспериментов. Изучая вопрос о том, в какой мере E^* играет роль в биологических процессах и насколько различные влияния на E^* могут объяснить действие лекарств или гормонов, мы также должны учитывать и время жизни возбужденных состояний соответствующих веществ. Действие лекарств может заключаться в изменении времени жизни или в изменении влияния на время жизни возбужденного состояния другого агента, вроде глутатиона.

Сахара и спирты

В эксперименте, описанном в § 5, длительное послесвечение родамина увеличивалось при добавке тиамина. В настоящем параграфе был описан такой же эффект, производимый натрием. Можно поставить вопрос: обусловлено ли такое возрастание излучения возрастанием или снижением стабильности триплетного состояния? Эти вещества могут вызвать увеличение излучения, делая триплеты менее стабильными и тем самым увеличивая вероятность обратного перехода возбужденного электрона из триплета на основной уровень ($T_1 \rightarrow G$ на рис. 5). Но возможно также, что усиление послесвечения этих веществ обусловлено увеличением стабильности триплетного состояния, что дает возможность

большей концентрации возбужденных молекул на триплетном уровне при насыщении его. Чем большее количество электронов находится в триплетном состоянии, тем больше вероятность того, что некоторые из них перейдут обратно в нижнее состояние, испуская свет. В этом случае мы должны ожидать, что электроны излучают свои фотоны с запозданием и проявляют признаки долгоживущего возбуждения. Долгоживущее возбуждение проявляет себя в виде фосфоресценции, наблюдаемой в медленно движущемся фосфороскопе. В присутствии тиамин или натрия роданин не обладает таким послесвечением, поэтому возможно, что в этом случае усиление излучения света обусловлено снижением стабильности или, по крайней мере, возросшей вероятностью перехода $T_1 \rightarrow G$.

Выше было приведено несколько случаев, в которых послесвечение возникает при добавлении 1—2% глюкозы к водным растворам красителей до их замораживания. Другие моно- и дисахариды, такие, как рибоза, галактоза, манноза, фруктоза, сахароза или мальтоза, действуют аналогично, тогда как высокополимеры, такие, как декстрин, крахмал (растворимый или нерастворимый) или агар, такого действия не производят. Возможное объяснение подсказывается следующим простым экспериментом: если в пробирке медленно заморозить раствор красителя (поместив ее в охлаждающую смесь при -20°C), то по краям пробирки образуется слой бесцветного льда, а краситель концентрируется в середине ее. Очевидно, что вода выкристаллизовывается, вытесняя краситель. Если же до замораживания добавить к раствору 1—2% сахара, то краситель окажется более или менее равномерно распределенным во льду. Сахар играет роль как бы посредника между льдом и красителем, делающего контакт между ними более тесным. Если переходу молекул красителя в триплетное состояние способствует именно структура воды, то вероятность образования и стабильность триплетов должны быть тем больше, чем теснее контакт между льдом и красителем.

Можно ожидать, что молекулы сахара образуют свои собственные «айсберги». В вышеприведенных экспериментах эти айсберги должны соответствовать водной решетке, образующейся при замораживании, так как иначе сахар вытеснялся бы замерзающей водой. Такая система льда и

сахарных айсбергов включает в себя молекулы красителя лучше, чем чистый лед. Однако добавление глюкозы не только усиливает фосфоресценцию, но и вызывает сильную флуоресценцию. В то время как чистый замороженный раствор роданина вообще не люминесцирует, при освещении замороженного раствора красителя с добавкой 1—2% глюкозы наблюдается, кроме фосфоресценции, также и сильная оранжевая флуоресценция, которая смешивается с красной фосфоресценцией и дает красно-оранжевое свечение. Чем выше концентрация сахара, тем сильнее флуоресценция. В присутствии 1% глюкозы излучение красно-оранжевое, в присутствии же 10% глюкозы оно становится чисто оранжевым, и интенсивная фосфоресцентная компонента может быть обнаружена лишь при помощи фосфороскопа, не пропускающего света флуоресценции. Таким образом, глюкоза как будто не только стабилизирует триплет, но и делает его отчасти также и менее стабильным, препятствуя переходу из синглетов в триплеты и способствуя переходу из триплетного состояния в основное.

Такое действие сахара может иметь свое биологическое значение. Дезоксирибонуклеиновая кислота, согласно модели Ватсона и Крика, состоит из стопки гетероциклических оснований, окруженных слоем пентоз и фосфатных кислот. Если основания служат для проведения энергии, то водная структура, создаваемая сахарами и фосфатами, служит для передачи в окружающую среду этой энергии, а вместе с ней и генетической информации, содержащейся в ДНК. Растворы ДНК (а также и РНК) обладают флуоресценцией в видимом свете, которая переходит в долгоживущую фосфоресценцию при замораживании. Ни одна из компонент нуклеиновых кислот сама по себе не обладает такой фосфоресценцией, что говорит о некотором коллективном воздействии на энергию, сообщенную системе. Длительная фосфоресценция растворенного вещества без добавления некоторых стабилизаторов вроде глюкозы — очень редкое явление. Очевидно, нуклеиновая кислота содержит обе компоненты — «фосфоресцирующие» гетероциклические основания и пентозу (а возможно, и фосфат) — в качестве стабилизаторов.

Слабая, короткоживущая фосфоресценция замороженного раствора акридин-оранжа также превращается в силь-

ную и долгоживущую при добавлении малых концентраций (10^{-3} М) АТФ. Эта реакция обусловлена двумя факторами: в первую очередь образованием стабильного комплекса между АТФ и красителем, который легче преципитирует, если реактанты присутствуют в более высокой концентрации. Аденозин-монофосфат ведет себя аналогичным образом, хотя фосфоресценция его комплекса слабее, чем комплекса с АТФ. Было найдено, что хотя аденин также образует комплекс с красителем, но в этом случае фосфоресценция не наблюдается. Очевидно, за стабилизацию E^* в комплексе АТФ-краситель ответственны айсберги пентоз и фосфатов. Эти же айсберги могут играть главную роль также и в мышечном сокращении.

Для того чтобы молекула добавленного вещества могла облегчить возникновение долгоживущих возбужденных состояний красителей, недостаточно, чтобы она была гидрофильна и могла образовывать айсберги. Возникновение такого эффекта зависит, очевидно, от внутренней структуры этих айсбергов, их взаимосвязи с массой льда и возбужденными молекулами. Если айсберги, образовавшиеся вокруг данного вещества, не соответствуют структуре воды, то в результате этого возникает разупорядочение структуры, которое будет препятствовать триплетному возбуждению. По-видимому, такое разупорядочение создают моно- и поливалентные спирты. Как уже отмечалось ранее, во льду, содержащем 5—10% глицерина, триплеты не образуются. Аналогично действуют моновалентные спирты вроде метанола или этанола, которые при 2%-ной концентрации полностью предотвращают образование триплетов. Между действием этих спиртов на триплетные возбуждения и их биологической активностью существует примечательный параллелизм, вызывающий предположение, что эта биологическая активность может быть обусловлена их воздействием на E^* . Два процента этанола временно прекращают большинство проявлений жизни (Гаддум); *in vitro* они полностью уничтожают триплетные возбуждения. Например, в водном растворе родамина, замороженном в присутствии 2% спирта, наблюдается лишь интенсивная оранжевая флуоресценция без каких-либо признаков красной фосфоресценции. Концентрация спирта в жидкости нашего организма, равная 0,2%, вызывает сильное опьяне-

ние; *in vitro* та же концентрация пресекает долгоживущие возбуждения в акридиновом желтом красителе, а длительное послесвечение акридин-оранжа, вызванное кортизоном, подавляется этанолом даже в концентрации 0,06%. В растворах родамина этанол в концентрации 0,2% частично превращает длительную фосфоресценцию в флуоресценцию. Более низкие концентрации алкоголя, которые нас лишь подбадривают и освобождают от процессов торможения, в растворах увеличивают фосфоресценцию, делая триплетное состояние менее стабильным. В этих экспериментах находит себе объяснение также отравляющее действие метанола, которое не может быть обусловлено лишь его неспособностью к окислению. Долгоживущее возбуждение акридин-оранжа, порожденное присутствием глутатиона, почти нечувствительно к 0,6% этанола, но полностью подавляется малейшими следами метанола. Триплетное состояние хлорофилла нарушается при концентрации метанола в десять раз меньшей, чем концентрация этанола. Так же чувствительно и долгоживущее возбуждение рибофлавина, стабилизированное глюкозой.

Результаты попыток удлинения времени жизни возбуждения суммированы в табл. II, из данных которой видны

Таблица II
Долгоживущая фосфоресценция в присутствии
глюкозы, глутатиона и АТФ в замёрзших
растворах акридин-оранжа, родамина В,
рибофлавина и хинидина

	Глюкоза (2%)	Глутатион (0,002 М)	АТФ (0,002 М)
Акридин-оранж.	+	+	+
Родамин В	+	+	0
Рибофлавин	+	+	0
Хинидин SO ₄	+	+	+

две особенности: первая — способность того или иного вещества удлинять время жизни триплетных состояний имеет определенную специфичность, как это видно на примере АТФ; вторая — в то время как сахара удлиняют время жизни лишь при сравнительно высоких концентрациях,

глутатион и АТФ удлиняют его при концентрациях, в сто раз меньших. Это указывает на то, что глюкоза действует посредством некоторого общего физического влияния, подобно изменению растворимости, тогда как другие два вещества действуют посредством более специфического механизма.

Пример глюкозы и спирта наводит на мысль, что вещества могут быть грубо разделены на две группы: те, которые хорошо подходят к водной структуре и отчасти увеличивают упорядоченность, и те, которые производят обратное действие. Вполне возможно, что вещества, играющие важную роль в жизни клетки и находящиеся в клетках в заметной концентрации, принадлежат первой группе. Вполне возможно также, что вещества, разрушающие упорядоченность водных структур, не пропускаются в клетку мембраной или даже выталкиваются наружу из упорядоченной внутриклеточной воды. Это наводит на мысль о новой теории клеточной проницаемости. Возможно, окажется также, что вещества, которые удлиняют время жизни возбужденного состояния другого вещества тем, что они играют роль посредников между ним и водой, увеличивают и способность этих веществ проникать в клетку.

13. ОБ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ ФОСФОРИЛИРОВАНИИ И ЕГО РАСЩЕПЛЕНИИ

Одним из участков наиболее интенсивного переноса энергии в клетке являются митохондрии, в которых происходит процесс окисления пищевых продуктов и запасаания освобождающейся при окислении энергии в молекулах АТФ, где она стабилизируется в форме энергии связей $\sim P$. Таким образом, если E^* играет роль в биологических процессах передачи энергии, то мы можем ожидать, что она должна принимать участие и в окислительном фосфорилировании. Мы могли бы подойти к этой проблеме с любой из двух сторон. Можно поставить вопрос так: производят ли вещества, нарушающие сопряжение реакций окислительного фосфорилирования, определенное действие на E^* в тех концентрациях, при которых это нарушение сопряжения имеет место? Но можно и, наоборот, задать вопрос о том,

вызывают ли вещества, известные своим действием на E^* , нарушение сопряжения в реакциях окислительного фосфорилирования.

Приступая к этой проблеме, мы должны будем на некоторое время вернуться назад к эксперименту с рибофлавином. В этом эксперименте было найдено, что при возбуждении витамин количественно переходит в триплетное состояние и не излучает света. Это отсутствие свечения находится в согласии с правилами квантовой механики, которые накладывают строгий запрет на радиационный переход из триплетного состояния в основное. Тем не менее в присутствии атмосферного кислорода такой переход происходит, и пробирка излучает оранжевую фосфоресценцию с максимумом интенсивности при длине волны 570 мμ. Это означает, что присутствие кислорода изменяет вероятность переходов $T_1 \rightarrow G$, делая возможными переходы, которые в его отсутствие практически не происходят. Когда происходит окислительное фосфорилирование, то имеется O_2 , и, таким образом, мы можем ожидать, что витамин принимает участие в этом процессе в возмущенном состоянии с измененной реактивностью. Следовательно, молекулярный кислород не только служит конечным электронным акцептором, но в то же время он регулирует реактивность центрального члена этой цепи, давая ему возможность выполнять свою функцию.

Это действие кислорода обладает довольно интересными особенностями. Концентрация кислорода в атмосфере низка (0,01 M), а его концентрация в воде должна быть еще значительно ниже, так как растворимость O_2 в воде мала. Эксперимент показывает, что если до замораживания привести раствор рибофлавина в равновесие с чистым кислородом, то это не усиливает люминесценцию; точно так же приведение раствора в равновесие с воздухом, разведенным десятью объемами N_2 , не понижает ее. Во всей этой широкой области значений концентрации действие кислорода максимально, и это дает основания думать, что он производит максимальное воздействие и при тех низких напряжениях, какие имеются в тканях животных.

Большинство химических реакций зависит от концентрации реагирующих партнеров. Тот факт, что действие O_2 не зависит от концентрации в столь широкой области

изменений молярной концентрации, совершенно необычен. Непосредственное взаимодействие между рибофлавином и O_2 можно исключить, так как концентрация O_2 , присутствующего в растворе в равновесии с разведенным воздухом, должна быть значительно ниже, чем концентрация присутствующего рибофлавина ($10^{-3} M$). Мы должны ожидать, что здесь действует необычный механизм, основанный на каком-то исключительном свойстве кислорода, которое может быть приведено в непосредственную связь с триплетным состоянием. Кислород, действительно, обладает таким свойством: он принадлежит к числу весьма редких веществ, парамагнитных в своем основном состоянии, а парамагнитные молекулы производят магнитное возмущение электромагнитного поля, которое, как известно, может изменить вероятности переходов между синглетными и триплетными возбужденными состояниями электронов.

Это объясняет также странную зависимость, или, точнее говоря, независимость эффекта от концентрации O_2 . До тех пор, пока эта концентрация остается настолько высокой, что статистически каждая молекула рибофлавина наверняка попадает в радиус действия молекулы O_2 , мы можем ожидать, что влияние будет оставаться максимальным. Радиус действия молекулы O_2 может быть подсчитан из концентрации, при которой кислород перестает оказывать максимальное действие. Мои эксперименты позволили мне лишь установить, что этот радиус должен быть довольно большим, порядка 100 Å.

Подытоживая, мы можем констатировать, что аэробная жизнь происходит в возмущенном электромагнитном поле и что это возмущение имеет большое влияние на ход реакций внутри этого поля. Если это так, мы должны принимать во внимание возможность нового механизма действия лекарств: лекарства могут также действовать, подавляя тем или иным путем воздействие O_2 . Если это воздействие O_2 на рибофлавин существенно, то мы можем ожидать, что вещества, устраняющие это влияние, будут влиять на процесс окислительного фосфорилирования, в котором рибофлавин играет важную роль. Таким образом, изучая действие агентов, нарушающих сопряжение реакций в этом процессе, мы будем исследовать изменения той оранжевой люминесценции, которой обладает рибофлавин в присутст-

вии O_2 . Можно сказать и обратное: если мы обнаружим, что лекарства, нарушающие сопряжение в окислительном фосфорилировании, имеют специфическое действие на триплетное возбуждение, то это подтверждает предположение о том, что E^* в ее триплетной форме играет важную роль в передаче энергии. Если такое лекарство производит специфическое действие на рибофлавин, то это будет подтверждать гипотезу, что рибофлавин участвует в процессе окислительного фосфорилирования через свое триплетное возбуждение.

Йодиды

К числу веществ, которые сильно тушат длительную люминесценцию рибофлавина, относятся йодиды. Они тушат это свечение полностью при концентрации $10^{-3} M$ и частично при $10^{-4} M$. При дальнейшем разведении их действие слабеет. Отсюда следует, что радиус действия молекулы йода имеет порядок 50 Å. Соответственно йод в малых концентрациях должен ингибировать окислительное фосфорилирование. Это положение проверили М. Мидельбрук и автор, которые обычным путем изолировали митохондрии из печени крысы и измерили потребление кислорода и фосфорилирование в присутствии бета-гидроксипирватата. Хлорид в суспензионной жидкости замещался различными количествами йодида. Отношение Р/О варьировалось в различных экспериментах между 2 и 2,6 при среднем значении 2,2. Результаты экспериментов суммированы на рис. 22. Как видно из этого рисунка, при концентрации йодида 0,03 M происходит полное подавление фосфорилирования, причем потребление O_2 оставалось неингибированным. Бромид производил аналогичное действие, но в соответствии с его более слабой тушающей способностью он должен был для достижения того же эффекта применяться в более высоких концентрациях.

Эти результаты расходятся с результатами Клемперера, который нашел, что йодид не производит действия на окислительное фосфорилирование. Его техника выделения митохондрий была несколько иной и, вероятно, лучше нашей. Возможно, что его отрицательные результаты были обусловлены мембраной митохондрий, которая в его экспериментах могла лучше сохраниться и не пропускать йодид

внутри митохондрий. Места, где происходит окисление, по-видимому, труднодоступны для йодида. Это объясняет, почему для подавления фосфорилирования приходилось применять концентрации более высокие, чем предполагалось.

Как упоминалось выше, рибофлавин, замороженный в присутствии 10^{-3} М йодида, имеет коричневатый цвет,

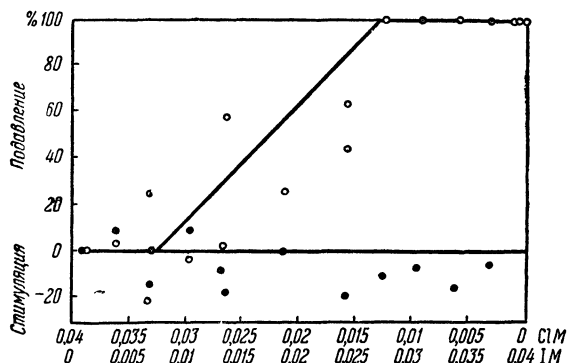


Рис. 22. Эффект замещения хлорида йодидом в физиологическом растворе при окислительном фосфорилировании митохондриями печени крысы, выраженный в процентах от контроля при 0,04 М хлорида. Белые кружки — фосфорилирование. Черные кружки — потребление кислорода.

что указывает на прямой переход из нижнего состояния в триплет. В то время как O_2 как будто делает триплеты нестабильными и вызывает переход электронов из триплета в основное состояние, йодид, по-видимому, производит противоположное действие, делая триплет стабильным, подавляя излучение света и увеличивая вероятность перехода $G \rightarrow T_1$ (рис. 5). Йодид наиболее сильно действует в концентрации 10^{-3} М. В большей концентрации он начинает уже действовать, как соль, нарушая водные структуры и делая триплетное состояние нестабильным.

Эти эффекты йода независимы от его заряда или связи. Связанный йод, например, в 3,5-дийодо-4-гидроксibenзоиновой кислоте производит в изомолярных концентрациях тот же эффект. Он подавляет излучение света и из-

меняет цвет раствора. Это говорит о том, что йод производит эти изменения не непосредственным химическим взаимодействием, а посредством электромагнитной связи.

Было найдено, что тироксин и трийодотиронин действуют так, как и ожидалось, исходя из того, что они являются соединениями йода: в концентрации 10^{-4} М они сильно подавляют излучение света рибофлавином. Нерастворимость этих веществ делает невозможным их применение в более высоких концентрациях. Поэтому можно ожидать, что оба эти гормона в концентрациях от 10^{-3} до 10^{-4} М также нарушают сопряжение реакций окислительного фосфорилирования в митохондриях, что было, действительно, обнаружено в работе Липмана и Мартиуса с сотрудниками.

Тушащее или стабилизирующее действие йодида на рибофлавин не специфично. Йодид в концентрации 10^{-4} М подавляет также фосфоресценцию растворов родамина (0,0001 М) при температуре сухого льда. Это находится в согласии с предположением, что активность йодида обусловлена тем, что он представляет собой довольно большой, мягкий и жирный ион; он имеет большое число электронов, способных к любым переходам между энергетическими уровнями, что дает возможность молекуле резонировать с другими молекулами. Высокий атомный номер этого элемента и соответственно большой положительный заряд его ядра создают возможность изменения знака спина возбужденного электрона при приближении к этому ядру.

Предположение, что йодид подавляет фосфоресценцию рибофлавина, а, возможно, также и окислительное фосфорилирование путем стабилизации триплетных состояний, может быть подтверждено следующим экспериментом: раствор рибофлавина был заморожен в присутствии 0,1 М NaCl. Вместо обычного оранжевого послесвечения при этом наблюдалось желтовато-белое излучение. Белый цвет указывал на смешанную природу излучения, тогда как желтая окраска указывала на возобновление флуоресценции. Что это действительно так, можно показать, рассматривая замороженную пробирку через фосфороскоп, отсекающий флуоресценцию. При этом в системе наблюдалась сильная красная фосфоресценция, превосходящая по интенсивности фосфоресценцию пробирки, в которую не добавлялся NaCl. Таким образом, NaCl делал систему нестабильной. Возбуж-

денные электроны рибофлавина не могли так же легко переходить в триплетное состояние, как они это делали в чистом льду, а если они и переходили, то их триплетное состояние было нестабильно, так что большинство электронов теряло свою энергию радиационным путем и возвращалось обратно в основное состояние. Если в дополнение к 0,1 М NaCl добавляли в раствор KI в концентрации 10^{-3} М, то фосфоресценция становилась слабее, а флуоресценция совершенно исчезала.

2,4-динитрофенол

Как было показано в исследованиях Лумиса и Липмана, 2,4-динитрофенол является классическим реагентом, нарушающим сопряжение реакций при окислительном фосфорилировании. Он производит это действие уже при низкой концентрации (10^{-4} М), причем окисление не только не подавляется, но даже усиливается. Именно из-за этого действия нитрофенол нашел применение как средство для похудения. Его медицинская доза 100 мг, что дает среднюю концентрацию в человеческом организме 10^{-5} М (при весе тела 60 кг и плотности 1,2). Но даже и меньшие единичные дозы, в 25 мг, соответствующие средней концентрации $4 \cdot 10^{-6}$ М, могут увеличить основной метаболизм на 30%. Молекула динитрофенола простая, не имеющая характерной растворимости; поэтому мы можем предположить, что она не имеет специфического сродства к тканевым или клеточным компонентам, а производит свое фармакологическое действие при равномерном распределении. Следовательно, если мы хотим подтвердить идею, что динитрофенол развязывает окислительное фосфорилирование, воздействуя на E^* , мы должны показать, что он может возмутить E^* в концентрациях этого порядка, т. е. 10^{-5} М и даже $4 \cdot 10^{-6}$ М. Эксперимент показал, динитрофенол в концентрации 10^{-5} М сильно тушит послесвечение раствора рибофлавина (10^{-4} М); даже в концентрации $4 \cdot 10^{-6}$ М действие динитрофенола еще заметно.

Таким образом, наш эксперимент *in vitro* согласуется с предположением, что при окислительном фосфорилировании *in vivo* нарушение сопряжения обуславливается воздействием на E^* , или, более конкретно, воздействием на E^* три-

плетного состояния рибофлавина, который может функционировать благодаря присутствию O_2 .

Тушащее действие динитрофенола на послесвечение рибофлавина может быть в какой-то степени названо специфическим. При концентрации 10^{-4} М динитрофенол не понижает в заметной степени фосфоресценции других веществ, например акридина, атербина или родамина, даже если она была усилена тиаминном.

При более высоких концентрациях динитрофенол заметно поглощает свет, и потому уменьшение фосфоресценции других веществ в его присутствии может быть объяснено непосредственной абсорбцией возбужденного света динитрофенолом. Наблюдаемое в этом случае тушение не является «истинным».

2,4-динитронафтол

Это вещество является тем же динитрофенолом, но с лишней антенной — к нему добавлено еще одно бензольное кольцо. Соответственно мы можем ожидать, что 2,4-динитронафтол будет взаимодействовать с E^* несколько сильнее, чем 2,4-динитрофенол.

Эксперимент *in vitro* показывает, что 2,4-динитро-1-нафтол подавляет фосфоресценцию рибофлавина почти в четыре раза сильнее, чем соответствующий динитрофенол; иными словами, для получения того же эффекта можно применить нафтол в концентрации, в четыре раза меньшей. М. Мидельбрук сравнила действие этих двух лекарств на ход окислительного фосфорилирования в митохондриях крысы. Ее результаты приведены на рис. 23. Как видно из этого рисунка, динитронафтол ингибирует окислительное фосфорилирование сильнее, чем фенол, останавливая его при более низкой концентрации. Но кривые показывают также, что, в то время как нитрофенол при низкой концентрации увеличивает потребление кислорода, нафтол производит обратное действие — он несколько понижает окисление. Тем не менее подавление фосфорилирования не может быть объяснено подавлением окисления, так как остающееся потребление кислорода должно было бы быть достаточным для поддержания фосфорилирования на его первоначальном уровне. Динитронафтол обладает более специфической раст-

воримостью, чем динитрофенол; он имеет большее сродство к липидам, чем к воде. Возможно поэтому, что он накоп-

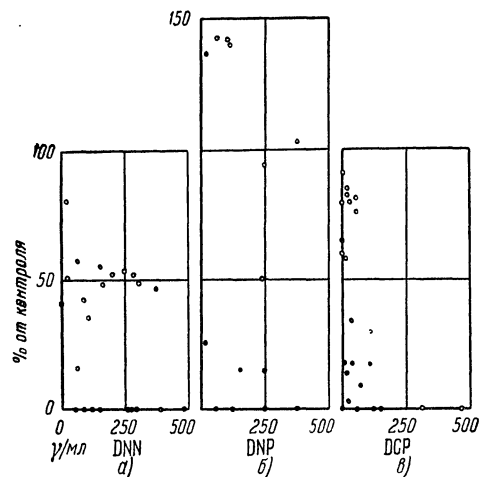


Рис. 23. Влияние динитронафтола (а), динитрофенола (б) и дихлорофенола (в) на потребление кислорода (белые кружки) и окислительное фосфорилирование (черные кружки) в митохондриях печени крысы.

ляется некоторыми составляющими клетки и производит биологическое действие, отличное от действия динитрофенола, который более растворим в воде.

2,4-д и х л о р о ф е н о л

Клоус и Краль нашли, что 2,4-дихлорофенол производит в яйцах *Arbacia* действие, аналогичное действию 2,4-динитрофенола: оба эти реагента при низких концентрациях вызывают усиленное потребление кислорода, а при более высоких концентрациях понижают потребление O_2 с полным подавлением клеточного деления. Это наводит на мысль, что механизм действия здесь аналогичен механизму действия нитрофенола. Однако эксперимент *in vitro* показывает, что, хотя дихлорофенол даже в концентрации 10^{-5} М производит сильное тушащее действие на фосфоресценцию рибофлавина, его действие менее специфично и он так же

хорошо влияет на возбужденное состояние других веществ, на которые нитрофенол не производит заметного воздействия. Так, например, было найдено, что он тушит желтую фосфоресценцию акридина (насыщенный водный раствор) при концентрации 10^{-4} М. Таким образом, можно ожидать, что дихлорофенол подавляет не только окислительное фосфорилирование, но и другие процессы. Это подтверждается экспериментами М. Мидельбрук. Ее результаты (см. рис. 23) показывают, что дихлорофенол, так же как и динитрофенол, полностью подавляет окислительное фосфорилирование при низких концентрациях, но в то же время он подавляет и потребление кислорода, так что в этом случае прекращение фосфорилирования может быть вторичным эффектом, обусловленным прекращением окисления.

Недавно было показано, что салициловая кислота также является сильным стимулятором метаболизма (Александр и Джонсон) и развязывает реакции окислительного фосфорилирования при концентрации в $5 \cdot 10^{-3}$ М (Смит и Джефри). Один грамм, медицинская доза для взрослого человека, соответствует средней концентрации 10^{-4} М. Салициловая кислота тушит послесвечение рибофлавина в концентрации 10^{-5} М.

14. ДЕПОЛЯРИЗАЦИЯ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ

Клеточная мембрана разделяет мир клетки надвое — на «внутренний» и «наружный». Она непосредственно испытывает воздействие окружающей среды. Своей избирательной проницаемостью и «насосной» деятельностью она определяет внутриклеточный состав, от которого зависят функции клетки. Мембрана имеет электрический градиент и, будучи большей частью отрицательной с внутренней и положительной с внешней стороны, представляет, следовательно, электрический двойной слой с определенным запасом потенциальной энергии, которая растрачивается при «возбуждении». Для создания этого потенциала и восстановления его после возбуждения ей необходима энергия. Энергия необходима ей и для совершения ее «насосного» действия — для перемещения ионов или молекул против концентрационных и электрических градиентов. И — последнее по месту, но не по значению, — ей необходима энергия для

поддержания ее структуры, которая, как и всякая живая структура, с физической точки зрения маловероятна.

Мышечное волокно представляет весьма благоприятный материал для изучения клеточной мембраны, так как функцией мышцы является сокращение, которое влечет за собой сильное изменение ее энергии, химизма и формы и поэтому может быть зарегистрировано простыми приборами и даже невооруженным глазом. Эти макроскопические изменения, составляющие так называемое «сокращение», представляют изменение физического состояния актомиозиновой системы. В живой мышце это достигается нарушением нормального мембранного потенциала. Какова бы ни была связь между мембранным потенциалом и актомиозином, остается в силе тот факт, что сокращение актомиозина в неповрежденной мышце указывает на нарушение мембранного потенциала, так сказать, делает это нарушение видимым. Линг и Герард нашли, что потенциал покоя мембраны может быть уменьшен до некоторого определенного значения без того, чтобы это вызвало сокращение. В исследованных мышцах этот критического значения потенциал сразу полностью исчезает и происходит сокращение. Это дает удобный способ сравнивать различные лекарства по их деполяризующему действию, так как наступившее сокращение непосредственно указывает на то, что под действием исследуемых лекарств потенциал снижается до 55 mV. Таким образом, мышца дает нам ясный ответ — «да» или «нет».

Если E^* участвует в энергетике мембраны, то лекарства, воздействующие на E^* , должны вызывать сокращения. Хайду и автор наблюдали, что 2,4-динитрофенол вызывает сокращения изолированной мышцы диафрагмы мыши. Одновременно то же наблюдали Барнес и Дуфф в Англии. Если это деполяризующее влияние 2,4-динитрофенола обусловлено воздействием на E^* , то можно ожидать, что и другие родственные вещества, которые также воздействуют на E^* , будут производить такое же действие и вызывать сокращение, причем их действие будет пропорционально их способности воздействовать на E^* , которая может быть измерена *in vitro*.

Полученные результаты приведены на рис. 24, взятом из работы Хайду и автора. На нем представлена кимографи-

ческая запись мышцы диафрагмы крысы, возбуждаемой электрическими импульсами с двумя различными частотами. Стрелками указан момент добавления 2,4-динитро-1-нафтола к физиологическому раствору, омывающему мышцу. Это добавление не производит немедленного действия, но, как показывает нижняя кривая, спустя некоторое время, линия основания начинает приподыматься и мышца переходит в контрактуру, развивая силу, которая в конечном

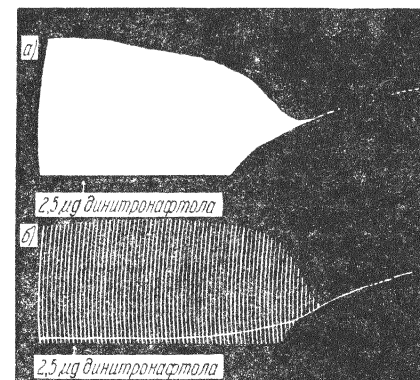


Рис. 24. Контрактура изолированной мышцы диафрагмы крысы под действием динитрофенола: а) нерв стимулировался с частотой 12 импульсов в минуту; б) то же самое с частотой 1 импульс в минуту. Стрелка указывает момент добавления 2,5 γ динитронафтола на миллилитр.

счете достигает значения, равного натяжению при полном сокращении. Эта кривая дает целый ряд полезных сведений. Высокое натяжение, достигаемое при контрактуре, указывает, что в мышце все еще имеется много АТФ. Как показывает сравнение верхней и нижней кривых, контрактура в обоих случаях начинается в одно и то же время и не зависит от частоты стимуляции. Следовательно, деполяризация, вызывающая эту контрактуру, не зависит от быстрой деполяризации, производимой электрическими единичными импульсами. Релаксация, т. е. восстановление поляризации

после этих импульсов, происходит с обычной скоростью даже после того, как начиналась контрактура. Таким образом, перенос энергии, происходящий при быстром восстановлении поляризации мембраны, следующем за возбуждением, не затрагивался динитронафтолом. (Эта быстрая реполяризация может быть замедлена такими веществами, как цианиды, которые пресекают всякую подачу энергии). Динитронафтол, по-видимому, воздействует на более медленные процессы, возможно, нарушая подачу энергии, необходимую для поддержания нормальной структуры мембраны или ее насосного действия.

Но какова бы ни была природа действия динитронафтола, мы можем ожидать, что он действует по принципу «все или ничего», т. е. либо производит контрактуру, когда он снижает потенциал до критического значения, либо вообще не производит какого-либо воздействия. Эксперимент показывает, что динитронафтол не производит воздействия при концентрации 1,25 μg на миллилитр, тогда как 2,5 μg на миллилитр вызывают максимальную контрактуру. 5 μg динитрофенола на миллилитр не производят действия, тогда как удвоенная концентрация производит максимальное действие; 2,7-динитрофенантренхинон и 2,6-динитротимол производили действие в дозах, промежуточных между этими двумя, тогда как 2,4,6-трийодофенол в четыре раза менее активен, а 3,5-динитросалициловая кислота вообще неактивна.

Согласно этим данным, динитронафтол в четыре раза активнее динитрофенола. Сравнение их действия на флуоресценцию рибофлавина показывает, что динитронафтол производит то же тушащее действие, что и динитрофенол, при концентрации, в четыре раза меньшей. Действие фенантренхинона и трийодофенола не удалось оценить вследствие их очень плохой растворимости в воде. 10 μg динитрофенола на миллилитр соответствуют концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М. Как было показано в предыдущем параграфе, при этой концентрации динитрофенол сильно тушит E^* , но влияние его постепенно уменьшается при дальнейшем разведении.

То, что наблюдаемая контрактура действительно была обусловлена деполяризацией мембраны, было показано Лэвенштейном и автором, которые измерили потенциал

покоя мембраны изолированного единичного мышечного волокна и нашли, что он уменьшается под действием динитронафтола, достигая критического значения примерно в то же время, когда начинается контрактура.

Таким образом, подытоживая результаты, мы можем сказать, что эксперименты подтвердили предположение о том, что нитрофенол производит свое биологическое действие, воздействуя на E^* , и что E^* участвует в поддержании поляризованного состояния мембраны.

Действие динитронафтола на мембрану изолированной мышцы согласуется с симптомами, вызываемыми этим веществом при внутрибрюшинном введении животным. Если взрослой мышце ввести от 2 до 3 мг этого вещества (в масляном растворе), то в течение часа животное не проявляет никаких патологических симптомов, а затем оно внезапно умирает. Спустя несколько секунд все его мышцы оказываются сильно контрактированными. Смерть наступает, очевидно, когда мембранный потенциал достигает критического значения Линга и Герарда. Если введенная доза недостаточна для снижения потенциала до этого значения, то животное остается живым и не проявляет каких бы то ни было симптомов заболевания.

Согласно нашему предположению E^* участвует в различных областях клеточной деятельности, поэтому можно ожидать, что симптомы животного в целом, обусловленные принятием токсической дозы такого вещества, как ароматические нитросоединения, воздействующие на E^* , зависят от того, к каким составляющим ткани или клетки данное вещество имеет большее сродство. Как уже говорилось, динитронафтол имеет специфическое сродство к клеточной мембране. Динитрофенол имеет как будто наибольшее сродство к митохондриям, и поэтому в его действии доминирующим оказывается влияние на клеточный метаболизм. Токсические дозы убивают животное гипертермией, тогда как меньшие и повторные дозы вызывают истощение.

Введение в ароматические соединения кислотных радикалов нарушает их биологическую активность, не изменяя оптических свойств. Возможно, что кислотные радикалы воздействуют на проницаемость, затрудняя проникновение реагентов в клетку. Соответственно было найдено, что динитронафтолсульфоновая кислота не вызывает острых

симптомов у животного при введении в тех же дозах, что и свободный нитронафтол; она не вызывает и контрактуры изолированной мышцы, хотя *in vitro* она тушит послесвечение так же интенсивно, как и динитронафтол. Тем не менее было найдено, что ее биологическая активность пропорциональна ее действию *in vitro* на E^* и равна активности динитрофенола: она убивает животное в тех же дозах, но делает это без специфических симптомов и за несколько дней, вызывая истощение животного.

ЧАСТЬ III

О ЛЕКАРСТВАХ, ГОРМОНАХ И БОЛЕЗНЯХ

«Бог создал маленькую мошку. Если ты раздавишь ее, то она умрет».

15. ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ О ЛЕКАРСТВАХ И БОЛЕЗНЯХ

Современная медицина характеризуется тем, что она в отличие от раннего эмпиризма основана на нашем понимании процессов, лежащих в основе болезней. Для понимания нарушенной структуры или функции необходимо сначала понять их в нормальном состоянии. Именно поэтому медицина на шаг отстает от успехов в познании основ. Зато можно ожидать, что любой успех в познании основ даст, как естественное следствие, плоды в медицине. И наоборот, если существует пробел в наших знаниях основ, то должна существовать бездонная пропасть и в нашем понимании болезней. Такая пропасть существует, и автор собирается в нее погрузиться, надеясь, что с помощью E^* ему удастся нащупать дно. Однако он предостерегает читателя, предубежденного против умозрительных построений, от следования за ним. В основном последняя часть этой книги будет чисто умозрительной.

В исследованиях автора всегда доминировала идея, что существует лишь одна живая материя, заселившая земной шар и принимающая в процессе приспособления к различным условиям различные формы, размеры, цвет и сложность. Жизнь, несмотря на большое разнообразие ее проявлений, построена на одном и том же ограниченном числе основных принципов, где бы и в каком бы виде мы ее ни встретили; между «королями и капустой» не существует реального различия. Но если основы нормальной жизни проще, чем ее проявления, то то же самое должно быть справедливо и для болезней. Большое разнообразие симптомов может быть вызвано нарушением одного основного механизма, и форма проявления болезни может не иметь прямой связи с лежащей в ее основе причиной. Например,

витамин В₁ является коферментом, одинаково необходимым для всех клеток — как животных, так и растительных, — и тем не менее его недостаток у высших животных вызывает полиневрит. Если высшие ненасыщенные жирные кислоты исключить из диеты крысы, то у животного отваливается хвост (Бурр и Бурр). Было бы ошибочно заключить отсюда, что биологическая функция таких кислот заключается в удержании хвостов на месте.

Нарушение какой-либо основной функции должно вести к болезни. Генерация и утилизация E^* является такой основной функцией, нарушение которой может проявить себя в различных симптомах или болезнях. Последняя часть этой книги будет посвящена попытке найти связи между E^* и «дегенеративными болезнями». Верный своей традиции, в качестве примера я возьму дегенеративную болезнь мыши. Трудности этой задачи двоякие. Во-первых, физическая теория флуоресценции и фосфоресценции находится все еще в зачаточном состоянии, так что нет твердой почвы, на которую мог бы встать биолог. Это в особенности относится к условиям в воде. Так как триплеты, образующиеся в воде, только что обнаружены, а открытие водных структур, образующихся вокруг неполярных веществ, принадлежит к самым последним достижениям науки, то неудивительно, что взаимодействие триплетов и водных структур является белым пятном на карте наших знаний. Во-вторых, если даже мы сумеем понять эти взаимосвязи, мы не сможем установить, каким образом определенные изменения проявят себя в биологической функции, например, как должно изменить жизнь клетки укорочение или удлинение времени жизни или изменение стабильности E^* . Поэтому в нашем первом подходе к проблеме мы должны довольствоваться показом того, что изменение E^* связано с изменениями в функциях и что вещества, воздействующие на E^* , воздействуют и на функции, а лекарства, воздействующие на функции, воздействуют также и на E^* . Для того чтобы доказать, что лекарства действительно могут осуществлять свою функцию, воздействуя на E^* , мы должны показать, что лекарства способны воздействовать на E^* *in vitro* в тех же концентрациях, в каких они производят свое действие *in vivo*. К сожалению, такого строгого параллелизма можно ожидать лишь для лекарств, не имеющих специфического сродства,

например для 2,4-динитрофенола. Лекарства с более специфической структурой и сродством накапливаются в соответствующих мишенях, и концентрация, в которой они производят свое биологическое действие, оказывается выше, чем это соответствовало бы их равномерному распределению. Чем выше специфичность, тем больше будет разрыв между действиями *in vivo* и *in vitro*, так как распределение *in vitro* равномерно.

Мы можем обойти эту трудность двумя путями: если лекарство оказывает свое биологическое действие воздействием на E^* , то оно должно иметь активное ядро (сопряженные двойные связи, группы NO₂ или SCN, йод и т. д.), которым обусловлено это действие. Рассматриваемое лекарство, если только его действие обусловлено влиянием на E^* , должно и *in vitro* действовать на E^* при тех же значениях концентрации, что и соответствующие соединения, которые не имеют специфического сродства из-за отсутствия специфических структурных деталей, обуславливающих это сродство, но имеют то же активное ядро. Приведем пример: если биологическое действие тироксина обусловлено его йодом, то мы должны ожидать, что *in vitro* он действует на E^* в тех же концентрациях, что и свободный йодид или другие органические соединения йода.

Другой путь, позволяющий избежать этих трудностей, заключается в выявлении менее специфических действий рассматриваемых лекарств (ни одно лекарство не является совершенно специфическим). Если E^* имеет общее значение для жизни клетки, то мы должны ожидать, что любое лекарство, действующее на E^* , будет в какой-то степени действовать на все клетки. Чтобы вызвать такие неспецифические явления специфическим лекарством, мы должны воздействовать им в больших дозах, чем это необходимо для создания специфического действия. Мы можем ожидать, что лекарство будет воздействовать на E^* *in vitro* в таких концентрациях, в которых оно производит свое неспецифическое действие *in vivo*. Приведем пример: хлорпромазин (см. § 16) производит специфическое действие на определенные нервные центры, но при более высоких дозах он воздействует на весь основной метаболизм. Если его фармакологическая активность обусловлена действием на E^* , то мы должны ожидать, что он воздействует на E^* *in vitro*,

в той же концентрации, в которой он воздействует на основной метаболизм *in vivo*.

К сожалению, при сравнении активных концентраций *in vivo* и *in vitro* мы встретим затруднение в определении концентрации в пробирке с замерзшим раствором. Вода имеет тенденцию выкристаллизовываться в чистом состоянии, оставляя растворенные вещества в более высокой концентрации. Поэтому, как бы быстро мы ни производили замораживание, всегда существует вероятность, что фактическая концентрация выше той, которая соответствовала бы равномерному распределению.

Прежде чем закончить этот параграф, я хотел бы вернуться к моей отправной точке — к кажущейся независимости симптомов от вызывающего их нарушения. Вполне естественно желание связать усиление функций с улучшением энергоснабжения, с избытком E^* , а ослабление функций с обратным действием. Однако в действительности происходит скорее наоборот. Приведем грубое сравнение: если автомобиль едет под гору слишком быстро, то более вероятно, что это происходит из-за повреждения тормозов, чем вследствие слишком сильной работы мотора. Термодинамически все биологические реакции являются реакциями «спуска под гору», т. е. они идут с понижением свободной энергии. Движущей силой химической реакции является тенденция любой системы снизить свою свободную энергию. Можно «вынудить» вещество к повышению содержания свободной энергии, заставить его идти «в гору», но в этом случае другое вещество должно спуститься «под гору», и даже ниже, чтобы покрыть энергетический расход. Быстрые биологические реакции должны быть «спуском под гору», т. е. идти с растратой свободной энергии, так как «под гору» процесс идет быстрее, чем «в гору». Следовательно, если сократимая материя или мембраны мышечного волокна растрачивают свободную энергию при своем функционировании, то они затем должны вновь получать приток энергии и находиться с большим запасом энергии в состоянии покоя, в котором они готовы к повторному действию. Более медленный «подъем в гору», т. е. возобновление запаса энергии, производится после завершения действия, во время покоя, как перезарядка аккумулятора. Следовательно, активным в большинстве случаев должно являться низкоэнергети-

ческое состояние, так как энергия была растрчена для его достижения. Так, например, низкоэнергетическим состоянием в мышце должно быть сокращенное состояние, ибо энергия растрчивается для совершения работы. Аналогично низкоэнергетическим состоянием мембраны должно быть ее разряженное состояние. Недостаточное снабжение системы энергией для возобновления ее высокоэнергетического состояния заставит систему оставаться в активном состоянии. Если, например, нарушено энергоснабжение мышечной мембраны, то волокну будет трудно поднять мембранный потенциал выше критического значения и мышца будет стремиться вновь перейти в сокращенное состояние. Пластика нервного окончания срабатывает в случае нормального потенциала покоя лишь один раз, в случае слабого энергоснабжения и обусловленного им низкого мембранного потенциала может срабатывать повторно, порождая миотоническое поведение. Если критический потенциал равен 55 mV, а потенциал покоя 100 mV, то пластинка нервного окончания должна перевалить через барьер в 45 mV. Джереник и Герард показали, что чем ниже этот барьер и чем хуже идет процесс возобновления запаса энергии, тем легче «срабатывает» пластинка нервного окончания. Таким образом, мы приходим к парадоксальной ситуации, заключающейся в том, что нарушение энергоснабжения ведет к повышенной активности, а усиление энергоснабжения может привести к бездействию, делая барьер слишком высоким.

16. О ЙОДЕ И ХЛОПРОМАЗИНЕ

Список лекарств, действие которых непонятно, длинен. Поэтому, попытаюсь установить связь между фармакологической активностью и E^* , мы вряд ли сможем сделать больше, чем взять один или два примера и посмотреть, не ведет ли учет роли E^* к лучшему их пониманию. Я возьму «нечто старое и нечто новое»: КJ и хлорпромазин.

КJ

Когда я был студентом-медиком, йод в виде КJ являлся универсальным лекарством. Никто не знал, что он делает,

но он что-то делал, и делал что-то хорошее. Мы, студенты, выражали это следующим стихом:

«Wenn du nicht weisst wo, was, warum,
Gebe dann Jodkalium» *).

Наши предшественники в медицине, обладая очень небольшим количеством, да и то лишь грубых, инструментов, вынуждены были широко пользоваться двумя инструментами, данными природой, применение которых с тех пор вышло из моды: глазами и мозгом. Они были проницательными наблюдателями, и универсальное применение йода было, возможно, и не лишено основания.

Так как йод не имеет специфической растворимости или сродства, то, если только его активность обусловлена воздействием на E^* , мы можем ожидать, что он действует на E^* *in vitro* в тех концентрациях, которых он достигает в организме при применении терапевтических доз. Разовая медицинская доза КJ равна 1 г, что создает в организме взрослого человека весом в 60 кг среднюю концентрацию в $2 \cdot 10^{-4}$ М. Таким образом, наш вопрос заключается в следующем: может ли йод J^- воздействовать на E^* в концентрациях порядка 10^{-4} М?

Выше было показано, что йод сильно тушит фосфоресценцию рибофлавина в концентрации 10^{-4} М. Указывалось также, что он, возможно, стабилизирует триплетные состояния этого витамина и способствует прямым триплетным возбуждениям. И все же его действие *in vivo* не ограничено рибофлавином, так как неизвестно, чтобы КJ воздействовал на нормальный метаболизм, и его лечебное действие, если таковое существует, является более общим. Эксперимент показывает, что КJ воздействует на E^* различных веществ. Он, например, сильно тушит желтую фосфоресценцию акридина в замерзшем (насыщенном) водном растворе в концентрации 10^{-4} М. Его действие на хинидин более красочно, так как более красочно и поведение самого хинидина. Как указывалось выше (§ 5), КJ в концентрации 10^{-3} М значительно усиливает желтую фосфоресценцию хинидина. При температуре сухого льда он в концентрации 10^{-4} М пре-

*) Если не знаешь где, что и почему, то пропиши тогда калий-йод.

вращает белесо-голубую люминесценцию в темно-синюю. В этой концентрации он может также удлинить время жизни, превращая возбуждение в долгоживущее, в особенности если раствор алкалоида «промыть» чистым азотом. При наблюдении с помощью быстрого фосфороскопа увеличение времени жизни, т. е. усиление светимости, заметно в присутствии КJ даже в концентрации 10^{-5} М.

В качестве терапевтического агента КJ не играет более важной роли. Однако в его действии на E^* все еще привлекает интерес тот факт, что тироидные гормоны являются соединениями йода и играют важную роль как в регуляции нормального запаса энергии нашего организма, так и при патологических процессах. Так как производимые йодом возмущения E^* не зависят от заряда или вида связи этого атома, то мы можем ожидать, что тироидные гормоны способны нарушать E^* так же, как и свободный йодид, и делают это *in vitro* в той же концентрации, что и эквимольный ион J^- . Это было проверено сравнением КJ, трийодотиронина и тироксина. Было найдено, что производимые ими действия весьма близки. Они удлиняли время жизни при концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М. Применить гормоны при более высоких концентрациях вследствие их нерастворимости нельзя. В организме животных, в силу своего специфического сродства, они накапливаются в определенных мишенях и могут производить эффект при более низкой средней концентрации.

Х л о р п р о м а з и н

Хлорпромазин производит наиболее яркое, уникальное действие в организме животных. Позднее этот препарат стал одним из основных лекарств для лечения шизофрении. Нет необходимости говорить о том, что если лекарство влияет на шизофрению, то оно должно влиять на некоторый процесс, включенный в патогенезис этого заболевания, и если оно действует влиянием на E^* , то очевидно, что E^* принимает то или иное участие в шизофрении. Таким образом, наша проблема здесь заключается в следующем: воздействует ли хлорпромазин на E^* и сравнимы ли те концентрации, в которых он действует на E^* *in vitro*, с концентрациями, в которых он производит лечебное действие *in vivo*? Хлорпромазин (рис. 25) является фенотиазином, а

представителем этой группы (пирлазот) мы уже встречались выше. Согласно сказанному раньше мы должны ожидать, что в хлорпромазине фенольное кольцо действует на E^* , тогда как боковая цепь определяет специфическое биологическое средство.

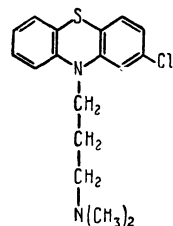


Рис. 25. Хлорпромазин.

Как известно из быстро растущей литературы по хлорпромазину, это лекарство вызывает у животных симптомы, близкие к симптомам спячки. Чтобы можно было сравнить это действие с действием на E^* *in vitro*, автор и С. Л. Бэрд измеряли скорость основного метаболизма у мышей. Результаты, не претендующие на оригинальность, приведены в табл. III*). Как видно из таблицы, действие хлорпромазина обладает примечательным свойством: в то время как действие других лекарств зависит от их концентрации,

*) Образование CO_2 измерялось в группах швейцарских мышей-альбиносов. Каждая из групп состояла из шести животных. Трое животных из каждой группы получало одинаковое количество «торазина», вводимого подкожно. Трое других служили контролем, указывая на нормальную скорость основного метаболизма. Выделение CO_2 измерялось индивидуально для каждого животного. Числа в табл. III представляют средние значения для трех мышей в идентичных условиях.

Аппарат для определения скорости основного метаболизма столь прост и столь хорошо работал, что заслуживает краткого описания. По существу, метод заключается в просасывании выдыхаемого воздуха через известное количество барита и измерении времени, необходимого для нейтрализации, при чем в качестве индикатора применялся тимолфталейн. Для установления более тесного контакта между баритом и воздухом, последний пропускаться через дисковый фильтр с тонкими порами (F на рис. 26). Было найдено, что и в этом случае некоторая часть CO_2 теряется, так как воздушные пузырьки слишком велики и прсходят сквозь жидкость слишком быстро. Это осложнение устраняется добавлением к бариту 5% бутилового спирта, в результате чего пузырьки делаются меньше и

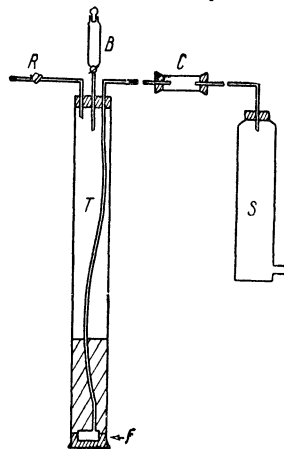


Рис. 26. Аппарат для измерения выделения CO_2 у мышей.

Таблица III

Влияние различного количества торазина (хлорпромазина) на скорость основного метаболизма и на температуру организма швейцарских мышей-альбиносов

Введенный торазин, мг	мг на кг	Общая молярная концентрация в животном	% понижения скорости основного метаболизма спустя три часа после инъекции	Температура организма спустя четыре часа после инъекции °C	Время, необходимое для полного восстановления, часы
10	251	0,0013	— 9	35	+
5	140	0,00073	56	27	48
2,5	80	0,00042	63	25,5	48
1,25	34	0,00018	63	25,1	24
0,63	19	0,00010	71	24,7	24
0,32	8,5	0,000044	51	26,6	12
0,16	3,7	0,000019	16	34,2	6

всплывают на поверхность намного медленнее. Весь аппарат состоит из шести единиц, что дает возможность одновременно изучать «продукцию» CO_2 от шести мышей. Схематически он изображен на рис. 26, где показана лишь одна из шести его единиц.

Эксперимент проводился следующим образом. 200 мл 5%-ного водного раствора *n*-бутанола помещалось в стеклянный цилиндр T , примерно 60 см длиной и 6 см в диаметре, закрытый с обоих концов резиновыми пробками. В контейнер B помещалось 10 мл 0,2 М барита с несколькими каплями 10%-ного спиртового раствора индикатора. Животное в маленькой цилиндрической проволочной клетке взвешивалось и помещалось вместе с клеткой в короткую стеклянную трубку C , закрытую с обоих концов резиновыми пробками. Сквозь этот контейнер просасывался воздух, очищенный от своего CO_2 в ловушке S с натронной известью. Из C воздух по резиновой трубке проходил через фильтровальный диск F из нержавеющей стали. Этот фильтровальный диск был вмонтирован в нижнюю часть резиновой пробки таким образом, что воздух мог выходить только с его верхней стороны. Воздух просасывался через цилиндр T при постоянном отрицательном давлении в 20 см Hg.

Выходящий из фильтра воздух образовывал мелкую пену, которая примерно до половины заполняла трубку T . Скорость потока воздуха регулировалась винтовым зажимом R . После установки прибора барит выливался в T , а контейнер B промывали. Отсчет времени начинался с момента заливки барита и кончался при полном обесцвечивании раствора. Время измерялось секундомером.

в случае хлорпромазина дозы от 8,5 до 140 мг на килограмм производят приблизительно одинаковый эффект, снижая скорость основного метаболизма вдвое. Доза в 8,5 мг производила примерно тот же эффект, что и доза, в 16 раз большая. Это наводит на мысль, что в этих концентрациях лекарство подавляет процесс, необходимый для поддержания нормального уровня метаболизма, но не необходимый для жизни. Дальнейшее увеличение дозы убивает животное, что заставляет предположить, что при больших концентрациях лекарство воздействует на более важный жизненный процесс. Ниже 8,5 мг на килограмм действие постепенно совсем исчезает. Вычислив общую молярную концентрацию в предположении, что 1,2 г веса тела соответствует 1 мл, получаем, что хлорпромазин в концентрации 0,0013 М убивает животное, в концентрации от 0,00073 до 0,000044 М производит почти одинаковое действие, а при концентрации около 0,00002 М действие его начинает убывать. Как показывает таблица, температура тела животных во время эксперимента падает, так что снижение скорости основного метаболизма может быть следствием понижения температуры. Это не уменьшает значимости нашего заключения; в этом случае мы должны лишь предположить, что лекарство оказывает свое действие на регуляторные механизмы, ответственные за поддержание температуры организма.

Молекула хлорпромазина обладает редкими свойствами в отношении ее собственных возбужденных состояний и ее собственной E^* . При замораживании раствора хлорпромазина с концентрацией 10^{-3} М наблюдается сильное желтое послесвечение, длящееся около секунды. В фосфороскоп эту фосфоресценцию можно наблюдать даже при концентрации 0,00003 М, т. е. во всей области, в которой лекарство производит сильное фармакологическое действие (столбец 3 в табл. III). Атмосферный кислород не уничтожает этого послесвечения, он только ослабляет его. Это, очевидно, связано с реакцией фенотиазинового кольца, так как тот же эффект наблюдается и в пиролазоте, хотя его послесвечение более чувствительно к O_2 , чем послесвечение хлорпромазина. Возбужденные состояния, которые очень чувствительны к O_2 , не могут иметь биологического значения. Такое длительное послесвечение является весьма редким.

Хлорпромазин способен также влиять на E^* других молекул *). В концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ М он подавляет фосфоресценцию рибофлавина, а при концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М он подавляет фосфоресценцию акридина и родамина В, даже если последняя усилена добавлением таких веществ, как риталин или тиамин. Таким образом, хлорпромазин способен подавлять фосфоресценцию других веществ во всей области значений концентрации, в которой он производит фармакологическое действие. При более высокой концентрации, например при 0,0014 М, он может тушить фосфоресценцию новой группы веществ, к которой принадлежат хинидин и атебрин, и возможно, что при этих концентрациях он убивает животное, так как тушит возбуждение молекул, участвующих в процессах, необходимых для жизни. Многие биологические катализаторы родственны по своей структуре хинидину и атебрину.

Еще одним примечательным свойством хлорпромазина является то, что он способен воздействовать на вероятность триплет-синглетного перехода других молекул в присутствии малых концентраций спирта, который вызывает смешанную флуоресценцию и фосфоресценцию. В акридине (насыщенный водный раствор плюс 0,125% метанола) он усиливает голубое свечение, обусловленное синглетными возбужденными состояниями. Его действие сильно сказывается при концентрации 0,00017 М и все еще заметно при концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М. В флуоресценции, родамине и рибофлавине он усиливает триплетные возбужденные состояния.

Все это говорит о высокой и яркой реактивности хлорпромазина по отношению к E^* *in vitro* в тех концентрациях, в которых он производит свое фармакологическое действие *in vivo*. Если принять во внимание химическую инертность этой молекулы, то этот факт в значительной мере подтверждает предположение, что она действительно производит свое влияние на биологические функции, воздействуя на E^* . Если хлорпромазин влияет на поведение шизофреников в концентрациях меньших, чем те, которые действуют на

*) Мы можем ожидать соответственно, что сопряжение реакций при окислительном фосфорилировании также может быть нарушено хлорпромазином. Это действительно было подтверждено позднее Бергером, Стрекером и Вэлшем.

основной метаболизм, то это может быть обусловлено либо его аккумуляцией в определенных нервных центрах, либо особой чувствительностью этих центров к изменениям E^* .

Рассмотренные два примера, КJ и хлоропромазин, были взяты произвольно. Их сильное действие на E^* и тождественность концентрации, при которых эти лекарства действуют на E^* *in vitro* и оказывают свое фармакологическое действие *in vivo*, побуждают распространить исследование и на другие лекарства. Это может привести к неожиданным результатам, например, к обнаружению действия на E^* там, где этого не ожидалось. Так было в случае морфия, новокаина и салицилата, которые, как оказалось, сильно тушат фосфоресценцию родамина в концентрации 10^{-4} М. Еще более активным оказался серпасиль, алкалоид из *Rauwolfia*, который также применяется для лечения шизофрении. Он полностью тушит фосфоресценцию рибофлавина в концентрации 10^{-4} М и подавляет желтую фосфоресценцию хинидина в концентрации 10^{-5} М, превращая излучение хинидина из белесо-голубого в темно-синее.

17. О МИОТОНИИ

Миотония является подходящим объектом для экспериментальных исследований, так как эта наследственная дегенеративная болезнь человека встречается также и у опытных животных — коз. Автор является счастливым владельцем небольшого стада этих животных, у которых миотония передается от поколения к поколению. Броун и Гарвей показали, что миотоническое поведение обусловлено повторными ответами оконечной пластинки нерва в мышце. Если нерв возбудить электрическим импульсом, то вместо того, чтоб произвести одну волну деполяризации, оконечная пластинка порождает целый ряд волн. В соответствии с этим, когда миотоническое животное, находящееся в покое, пытается сделать резкое движение, оно на некоторое время напрягается и затем начинает медленно двигаться спазматической походкой. В более тяжелых случаях животное теряет равновесие, падает и некоторое время оказывается не в состоянии подняться. Как и в случае миотонии у человека, при упражнении симптомы ослабевают, так что после того, как животное начало двигаться, симптомы быстро исчезают и живот-

ное ведет себя нормально. Миотоническое поведение не проявляется у животного, которое энергично движется.

Броун разработал простой метод, который позволяет измерять степень заболевания и характеризовать его числами, не применяя сложного электронного оборудования. Метод заключается в том, что животное подвешивают на поясах над землей. Животное держат в таком положении от 15 до 30 мин., затем внезапно опускают его на землю. Предварительно животное приучается к тому, что оно стремится в определенное место, например в угол, где оно может найти корм или укрытие. В эксперименте измеряется время, необходимое животному для достижения этого места. Миотонические животные под влиянием шока внезапного падения напрягаются и тратят больше времени на достижение своего угла. Моим козам требовалось от 7 до 20 сек. вместо двух или трех. При стандартных условиях с одним и тем же животным эксперимент дает удивительно воспроизводимые результаты; время пробега в различные дни различалось не более чем на 3 сек.

Другим обстоятельством, еще более усиливающим интерес к миотонии, является то, что симптомы этого заболевания могут быть точно воспроизведены принятием лекарства — 2,4-дихлорофеноксиуксусной кислоты, обычно называемой 2,4-Д. Бухер обнаружил, что это лекарство вызывает симптомы миотонии у лабораторных животных, таких, как мыши и крысы. Эйзагир, Фольк, Цирлер и Лиенталь показали, что электрическое поведение мышцы, отравленной 2,4-Д, аналогично поведению миотонической мышцы: в ответ на единичный электрический импульс возникает целый ряд волн возбуждения. Эта возможность воспроизведения дегенеративной болезни с помощью лекарства является весьма интересной. Интерес еще более усиливается тем, что 2,4-Д также известна как сильный гормон роста растений и широко применяется для борьбы с сорняками. Это указывает на основное единство принципов, на которых построен мир животных и растений.

Пытаясь найти связь между миотонией и E^* , можно начать с попытки показать, что 2,4-Д каким-то образом действует на E^* и производит это действие в тех же концентрациях, в которых она вызывает симптомы миотонии у животных. Подтверждение этого сделало бы более правдо-

подобным то, что наследственная миотония также является, в сущности, нарушением E^* , близким по своей природе к нарушению, вызываемому лекарством. По данным предыдущих исследователей, 300 мг препарата 2,4-Д на килограмм веса, данные крысе внутрь, представляют летальную дозу, тогда как 200 мг вызывают сильные симптомы миотонии. Автор повторил эти эксперименты на швейцарских мышах-альбиносах и подтвердил их. Его результаты приведены в табл. IV. Таблица также показывает продукцию CO_2 .

Таблица IV

Скорость основного метаболизма и миотонические симптомы у мышей, отравленных 2,4-Д

Доза инъекционной 2,4-Д, мг на кг	Продукция CO_2 , мг на кг веса мыши в минуту	Интенсивность симптомов миотонии
300	—	Летальная
200	38	+++
100	56	+
50	80	0
25	84	0
0	97	0

Примененный здесь метод тот же, что и в случае изучения хлорпромазина. Как можно видеть, симптомы миотонии сопровождаются падением скорости основного метаболизма, который при дозе в 200 мг снижается примерно до одной трети первоначальной величины; доза в 250 мг на килограмм веса снижает ее до одной четверти и вызывает у животного сонливое состояние, в котором с трудом заметны признаки жизни. Падение скорости основного метаболизма сопровождается резким падением температуры организма, примерно до 22°C , общее состояние походит на спячку. Падение температуры организма делает затруднительным определение того, насколько скорость основного метаболизма и кома непосредственно обусловлена действием лекарства. Интенсивность симптомов в значительной степени зависит от внешней температуры. Если животное содержать в тепле, то симптомы, сопровождающие миотонию, проявятся более

резко и, таким образом, миотоническое поведение станет более ясно наблюдаемым. Во всяком случае симптомы показывают, что действие лекарства не ограничено мышцей и что оно воздействует на некоторые основные процессы, общие для всех клеток, каковыми и является передача энергии. Таблица показывает даже, что падение скорости основного метаболизма (не замеченное предыдущими исследователями) является более чувствительным индикатором действия лекарства, чем миотонический синдром.

Так как доза в 200 мг на кг соответствует средней концентрации в 10^{-3} M , то возникает вопрос: может ли 2,4-Д в концентрации 10^{-3} M воздействовать на E^* *in vitro*?

В § 8 было показано, что 2,4-Д в концентрации 10^{-3} M сдвигает спектр абсорбции родамина в сторону более длинных волн. Следовательно, она вносит некоторое нарушение в энергетические соотношения этой системы, что проявляется в понижении энергии возбуждения красителя. Такой сдвиг значений энергии легко может вызвать нарушение в клетке, в которой, как можно ожидать, энергетические уровни согласованы очень точно. Подобное снижение энергии возбуждения может, например, воспрепятствовать переходу возбужденной молекулы из синглетного в триплетное состояние, энергетический уровень которого обычно несколько ниже; если же энергия синглетного возбуждения снизится, то разность уровней энергии между двумя состояниями может стать недостаточной для совершения перехода.

Мы видели, что 2,4-дихлорофенол является сильным тушителем различных возбужденных состояний, и поэтому странно, что 2,4-Д не производит подобного воздействия. С другой стороны, 2,4-Д проявляет другие действия, которых не производит 2,4-дихлорофенол. Одним из них является снижение длительности жизни триплетного возбуждения. Как было показано раньше, глютатион удлиняет длительность свечения родамина от 10^{-3} сек. приблизительно до одной секунды. Наблюдаемое с помощью фосфороскопа длительное послесвечение чисто водного замороженного раствора родамина очень слабо, но в присутствии 0,01 M глютатиона оно становится значительно сильнее и может наблюдаться даже в медленном фосфороскопе. Добавление 2,4-Д в концентрации 10^{-3} M полностью уничтожает это долгоживущее свечение. В ее присутствии

послесвечение в пробирке не усиливается даже в быстром фосфороскопе. Таким образом, 2,4-Д полностью уничтожает долгоживущее возбуждение, вызванное добавкой 0,01 М глутатиона или 2% глюкозы. Даже в количестве, в десять раз меньшем 2,4-Д производит еще эффект настолько сильный, что его нельзя объяснить взаимодействием 2,4-Д с глутатионом, и, следовательно, лекарство действует на возбужденные состояния, сильно понижая стабильность триплетного состояния. Если такие состояния вследствие их большой длительности имеют важное значение для энергоснабжения клетки, то легко видеть, что 2,4-Д должна вызывать глубокие нарушения в энергетике клетки. Эксперименты показывают, что 2,4-Д может подавлять долгоживущую фосфоресценцию даже в концентрации 10^{-4} М; в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М она тушит также желтую фосфоресценцию хинидина.

На лабилизацию триплетного состояния указывает еще одно наблюдение. Как уже говорилось выше, нормальное флуоресцентное излучение родамина оранжевого цвета, тогда как фосфоресценция красная. Было найдено, что 2,4-Д изменяет цвет люминесценций из красного в оранжевый во всех тех концентрациях, в которых она понижает время жизни возбужденных состояний. Таким образом, в ее присутствии молекула родамина не может переходить в триплетное состояние или, если и может переходить, то в меньшей степени, чем в ее отсутствие. 2,4-Д делает триплетное состояние маловероятным.

Аналогичные наблюдения могут быть проведены также с рибофлавином, флуоресценция которого зеленовато-желтая, а фосфоресценция оранжевая. Эксперимент показывает, что 2,4-Д в концентрации 10^{-4} М превращает цвет излучения замерзшего раствора рибофлавина с концентрацией 0,0001 М из оранжевого в зеленовато-желтый. Это изменение цвета указывает на то, что излучение света в основном происходит с синглетного возбужденного уровня. В фосфороскоп же наблюдается только красно-коричневое «фосфоресцентное» излучение света. Это говорит о том, что зеленая флуоресценция не является «затяжной» и происходит не в результате обратных переходов из триплетного состояния в синглетное, а вследствие того, что молекулы не могут перейти в триплетное состояние. В пробирках с

рибофлавином 2,4-Д послесвечение сильнее, чем в контрольной, содержащей только рибофлавин, что указывает на то, что часть возбужденных молекул все еще переходит в триплетное состояние, но это триплетное состояние мало стабильно.

То, что наследственная миотония каким-то образом связана с нарушениями энергоснабжения, следует и из наблюдений Хайду и автора, которые установили, что 2,4-Д-динитро-1-нафтол, являющийся сильным тушителем E^* , усиливает симптомы этого заболевания у коз.

Имеются наблюдения, согласно которым нарушения, наблюдаемые в случаях наследственной миотонии, не локализованы в мышцах, а имеют более общий характер, так же как и при действии 2,4-Д. Известно, например, что миотонические козы склонны к мертворождению. У меня также коза погибла в начальной стадии беременности без какой-либо видимой причины: животное просто издохло. В то же время у меня создалось впечатление, что мои козы от поколения к поколению мельчают, хотя это специально и не регистрировалось. Можно предположить, что у людей миотония также представляет локализованное выражение более общего нарушения, затрагивающего некоторый основной процесс жизни клетки. Как вообще известно, миотония часто сопровождается катарактами, которые даже относятся к классическим симптомам этой болезни. Нарушение это, следовательно, затрагивает даже такой сравнительно неактивный орган, как хрусталик. В связи с этим стоит отметить, что 2,4-динитронафтол, нарушающий энергетику организма, также вызывает катаракты *); это тем более примечательно, что хрусталик, как я показал, содержит сильно флуоресцирующие белки. Бухтал и Клемансен, а также де Жон нашли, что при дистрофических формах

*) Эти катаракты известны своим причудливым характером. Иногда они появляются после легкого лечения, а часто не наблюдаются даже после длительного и сильного лечения. Очевидно, решающее значение имеет субъективное предрасположение. Большинство собранных мной на бойне хрусталиков быков оказалось бесцветными. Однако небольшая часть их, примерно 2—3%, была желтой, что как будто обусловлено окисленным состоянием присутствующего флавина. Этот цвет, возможно, указывает на вялость энергетических процессов, что может находиться в связи с той легкостью, с которой катаракта образуется при лечении динитрофенолом.

миотонии поражается также и центральная нервная система; многие пациенты проявляли определенную тупость, граничащую часто с идиотизмом.

Миотония является редкой и не смертельной болезнью, и поэтому исследователи-медики уделяли ей сравнительно мало внимания, хотя сама по себе она очень интересна. Важное практическое значение ей придает ее близкое родство с *myasthenia gravis*. Симптомы обеих этих болезней почти идентичны, но только с противоположным знаком: что положительно в одной, отрицательно в другой. Они являются как бы зеркальным отражением друг друга. Миотоническая мышца делает больше, чем она должна делать, миастеническая — меньше. Миотоническая мышца работает хуже в начале действия, и симптомы исчезают при упражнении, тогда как миастеническая мышца работает лучше после отдыха и быстро утомляется. Следовательно, обе болезни могут быть выражением нарушения одного и того же основного процесса, но нарушения, идущего в противоположных направлениях.

Эксперименты, описанные в этом параграфе, оставляют неразрешенной проблему молекулярного механизма миотонии. Они подтверждают предположение, что при этом заболевании нарушается перенос энергии, возможно, вследствие лабильности триплетных состояний и вытекающего из этого укорочения времени их жизни. Такой эффект может быть обусловлен недостатком стабилизирующих агентов, таких, как глутатион, или присутствием лабилизирующих агентов, аналогичных 2,4-Д. Во всяком случае описанные эксперименты указывают дальнейшие пути исследования и должны быть расширены. Они наводят, например, на мысль о поисках вещества, делающего триплеты более стабильными, а переходы в триплетные состояния более вероятными. Вещества, действующие таким образом, существуют. Некоторые из них упоминались выше: это — йодид или йод в его органически связанной форме. Среди обычных составляющих клетки имеются и другие такие вещества. Как было показано, одним из них является серотонин, вторым — лизергиновая кислота. В этом направлении возможна интенсивная экспериментальная работа, и эта работа, быть может, не только приведет нас к лучшему пониманию дегенеративных болезней мышцы, но и откроет

пути их излечения. В этом отношении несколько подбадривает то, что, как оказалось, амфетамин и эфедрин вызывают такие же изменения в возбуждении рибофлавина, как и 2,4-Д. Один из них (эфедрин) известен своим целебным действием на миастению, и может оказаться, что этот эффект в еще большей степени будет вызываться другими лекарствами, производящими аналогичное эфедрину, но более сильное действие на *E**.

У человека симптомы миотонии могут быть ослаблены хинидином. Интересно отметить, что, как установлено С. Л. Бэрдом (не опубликовано), это лекарство оказывается активным также и в случае миотонии, вызванной в мышце с помощью 2,4-Д. То, что 2,4-Д укорачивает время жизни возбуждения, а хинидин имеет сильную тенденцию удлинять свое время жизни в присутствии различных веществ, не может быть случайным совпадением.

18. О ТИМУСЕ *)

Удаление тимуса часто оказывает благотворное действие на больных миастенией. Следовательно, существует некоторая связь между этой болезнью и железой, в которой в случае успешной операции наблюдаются также признаки гиперфункции. Если миастения связана с тимусом, а миотония является ее зеркальным отражением, то должна существовать также некоторая зависимость между этой железой и миотонией, которая, возможно, связана с гипofункцией тимуса.

Существует любопытная диспропорция между величиной тимуса и объемом наших знаний о его функции. Если эта железа вообще относится к числу желез внутренней секреции, то в раннем детстве она является наибольшей из таких желез, тогда как наши знания о ее функции близки к нулю. Почему-то тимус не привлекает внимания исследователей. Трактаты по эндокринологии, такие, как книга Пинкуса и Тимана, не посвящают ему даже отдельной главы. Это

*) Тимус — расположенная в брюшной полости железа внутренней секреции, часто называемая в русской анатомической литературе «вилочковой железой». Поскольку, однако, термины «тимусовая железа» или просто «тимус» также получили уже достаточно широкое распространение, мы сохранили их в переводе. (Прим. ред.)

отсутствие интереса, возможно, обусловлено тем, что тимус может быть удален без каких-либо вредных последствий. Если его не удалить, то природа сама его исключает, атрофируя в юношеском возрасте. Если мы можем жить без него, то функция его не может быть крайне необходимой. Логика эта безупречна. Но вопрос заключается в том, не следует ли природа своей собственной логике.

Гистологически тимус является лимфоидной тканью и вместе с селезенкой, костным мозгом и лимфатическими железами составляет часть лимфатической системы, хотя он и имеет некоторые особенности. Таким образом, если тимус представляет собой железу внутренней секреции, то вполне возможно, что вся лимфатическая система является таковой, хотя она также имеет и другие функции. Можно предположить, что эта железа производит вещество, принимающее участие в построении организма, в синтезе его белков, на которое имеется большой спрос в раннем детстве, когда построение идет более активно. Поэтому в этот период лимфатическая система, возможно, дополняется тимусом. В юношеском возрасте, когда построение тела закончено, дополнительная железа атрофируется. Этим объясняется также, почему удаление тимуса не вызывает нарушения, даже если его функция имеет важное значение: при этом выполнение его функции берет на себя остальная лимфатическая система. Примеров такой компенсации имеется много. Таким образом, наша логика, быть может, и не безупречна, и при современном уровне наших знаний возможно, что вся лимфатическая система представляет одну большую железу внутренней секреции, даже, быть может, самую большую и наиболее важную. Это обстоятельство до сих пор упускалось из виду только вследствие того, что оно слишком очевидно.

Такие предположения могут также объяснить, почему удаление тимуса благотворно действует лишь на часть больных миастенией. Если миастения обусловлена нарушением функции лимфатической ткани, то результат удаления тимуса зависит от того, в какой мере это нарушение функции локализовано в тимусе.

Для миастении характерна сильная утомляемость мышц. Меня часто поражала сильная утомляемость детей. Я почти приходил к заключению, что все дети миастеничны. Взрос-

лая собака может перегнать почти всех других животных, а трехлетний ребенок, который имеет примерно то же самое количество мышц на вес тела, устанет от короткой прогулки и неспособен поднять тяжелый груз. Следовательно, природа заботится о том, чтобы тогда, когда процесс роста идет особенно интенсивно, усиление этой функции не мешало ему. Природа часто убивает одним выстрелом более чем двух зайцев, и вполне возможно, что одно и то же вещество принимает участие в процессе построения и в то же время удерживает мышцу на низком функциональном уровне.

Допущенное предположение, что тимус (а возможно, и другие части лимфатической системы) производит некоторое вещество, участвующее в синтезе белков, находит некоторую поддержку в наблюдениях Гудернатша, работы которого несколько десятилетий тому назад привлекли на некоторое время внимание к тимусу. Гудернатш показал, что у головастиков, выращенных на тимусных железах, наблюдается запаздывание метаморфозы и усиленный рост, в результате чего они развиваются в гигантских головастиках. Попытки выделить активное вещество, ответственное за этот эффект, не имели успеха, и интерес постепенно спал, оставив впечатление, что тимус поставляет скорее некоторый «питательный фактор», чем гормон роста. Гормональная теория была возрождена позже экспериментами Хармса, установившего, что у личинок саламандры после удаления тимуса наступает общая атрофия, которая может быть предотвращена пересадкой тимуса. Гудернатш показал также, что питание тиреоидными веществами производит действие, противоположное действию тимуса. В то время как тимус задерживает метаморфозу и способствует росту, тиреоид способствует метаморфозе и ингибирует рост. Первый порождает гигантских головастиков, второй — карликовых лягушек; это наводит на мысль, что между ними существует некоторый антагонизм. Нет нужды приводить литературу по этому вопросу, так как это уже хорошо сделано Гудернатшем и Хармсом. В итоге, кажется, можно сказать, что если выразить все возможности в виде функции тимуса, то интеграл окажется нулем.

Техника выделения настолько усовершенствовалась за последнее десятилетие, что, как правило, выделение веществ само по себе не представляет особой проблемы. Успех

зависит от теста на неизвестное вещество, который дает нам возможность установить его количество в различных фракциях в процессе манипуляции. Трудность заключается в том, что мы должны подыскать тест для некоторого вещества, которое само должно быть установлено этим тестом. Это замкнутый круг, который как-то должен быть разорван.

В этом направлении автор предпринял неудавшуюся попытку, рассуждая следующим образом: небольшие количества биологически активных нормальных составляющих организма обычно производят действие на животное, если в них до этого ощущался недостаток. Например, витамины производят поразительные эффекты только в случае авитаминоза. Если миотония обусловлена отсутствием гипотетического тимусного гормона, то миотонические козы будут наиболее подходящим тест-объектом для этого гормона. Поэтому были вытренированы по Броуну четыре козы для измерения времени их пробега. Затем им ежедневно инъецировался экстракт тимуса, который содержал в 5 мл вещество, экстрагированное из 150 г замороженного тимуса теленка; эта фракция не преципитировалась изоэлектрически, не осаждалась метанолом, но преципитировалась избытком ацетона *). Результаты этих экспериментов по-

*) Препарат 1. Размельчали 16 кг замороженной тимусной железы теленка, заливали 28 л воды и проводили через коллоидную мельницу. После добавления 414 мл ледяной уксусной кислоты суспензия разбавлялась 30 л воды. Нерастворенное вещество отделялось на центрифуге Шарпля, и прозрачная жидкость концентрировалась в две стадии в вакууме при 20—23° С до 1,4 л. Жидкость хранилась в течение ночи при —20° С. После оттаивания преципитат удалялся малой центрифугой Шарпля. Добавлялось четыре объема метанола, преципитат отделялся, жидкость вновь держалась при —20° С. Вновь образованный преципитат опять отделялся. Жидкость, оставшаяся после удаления метанола, ядовита для мышей, возможно из-за содержащегося в ней калия. При сильном перемешивании постепенно добавлялась концентрированная серная кислота, в результате чего образовался белый кристаллический преципитат, по-видимому являющийся K_2SO_4 . Серная кислота добавлялась до тех пор, пока дальнейшее добавление 10%-ной серной кислоты не перестало вызывать заметной преципитации. В этом состоянии pH равно примерно 5.

Раствор концентрировался в вакууме до 500 мл. Добавлялись 2 л ацетона, выделялся преципитат, который удалялся вместе с ацетоном. Надосадочная жидкость отбрасывалась, а полужидкий преципитат вновь растворялся в 500 мл воды. Эта фракция инъецировалась после нейтрализации с добавлением небольшого количества пенициллина для предотвращения инфекции.

казаны на рис. 27. Внешние условия были неблагоприятны, так что время пробега было не столь постоянно, как в предыдущей работе, выполненной совместно с Хаду *).

В опыте с Бент Хорн, Шорти и Спотти, тремя молодыми, приблизительно пятнадцатимесячными козами, результаты оказались как будто положительными. В опыте со старой козой Нэнни, принадлежащей к первоначальному стаду, полученному во вполне взрослом состоянии четыре года тому назад, результат оказался отрицательным. Рис. 27 наводит на предположение, что в нашем экстракте присутствует активное вещество, способное облегчить или уменьшить симптомы миотонии. Экстракты не производят резкого эффекта, а развивают свое действие постепенно. Это действие продолжается после инъекции и постепенно исчезает. Следовательно, присутствующее вещество действует не как лекарство, влияние которого оказывается наибольшим при максимальной концентрации.

Миотонические козы не являются идеальными объектами для исследования. На их содержание требуются значительные затраты средств и труда. Измерения требуют много времени. Таким образом, окон-

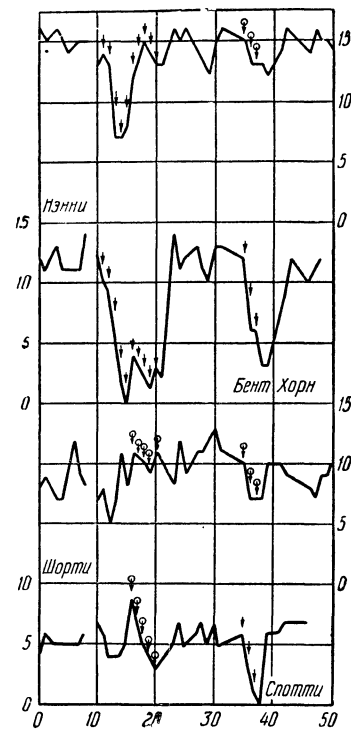


Рис. 27. Время пробега миотонических коз. Абсцисса — дни, ордината — время пробега в секундах. Стрелки — инъекция экстракта тимуса. Стрелки с кружками — инъекция физиологического раствора.

*) В первые три дня время пробега измерялось за час до и через час после инъекции. Между двумя измерениями не было заметного различия, следовательно, инъекция не производила резкого эффекта; поэтому время пробега стали изменять только до инъекции.

чательное выделение активного агента, если таковой существует, должно дожидаться разработки более простого теста или организации более широкого использования коз в качестве тест-объектов.

Выделение активного элемента тимуса крайне необходимо, так как вполне возможно, что миотония и мышечная дистрофия — родственные болезни и обе они обусловлены гормональной активностью тимо-лимфатической системы.

Имеется несколько наблюдений, указывающих на то, что тимус каким-то образом участвует в синтезе нуклеотидов, а следовательно, также и в синтезе нуклеиновых кислот, которые в свою очередь участвуют в синтезе белков. Указанием на это может служить исключительно высокое содержание ДНК в тимусе. Мои экстракты тимуса дают лишь одну реакцию, отличную от реакции аналогичных экстрактов других органов: они изменяют цвет люминесценции акридин-оранжа и акридина желтого, если эти красители добавлены в малых концентрациях (10^{-4} M), и дают преципитат, когда эти красители добавляются в более высокой концентрации. Наблюдаемая под ультрафиолетовой лампой люминесценция в случае акридин-оранжа сдвигается в красную сторону, а в случае акридина желтого тушится. Нуклеиновые кислоты и адениннуклеотиды производят аналогичные реакции, и поведение моих экстрактов может быть объяснено очень большим содержанием в них нуклеотидов. Комплекс акридинового красителя с нуклеиновым веществом очень стабилен, так что нет ничего удивительного в том, что, как нашли Льюис и Голанд, акридиновые красители, подобно трипафлаину, вызывают атрофию тимуса. Это указывает на то, что можно попытаться найти терапевтическое действие производных акридина на миастению, виновником которой предполагается тимус.

Многообещающий желтый краситель, который я ранее выделил из экстракта тимуса (1955), оказался окисью аскорбиновой кислоты, которая особенно обильна в этой железе.

19. ОБ ОКИСЛЕНИИ, ФЕРМЕНТАЦИИ И РАКЕ

Из числа двух биологических механизмов, являющихся источниками энергии, в этой книге ничего не говорилось о ферментации, так как не было оснований предполагать, что

E^* участвует в этом процессе, который по существу состоит из сопряжения фосфата с углеводом и затем такой перегруппировки Н и О атомов в молекуле, что энергия внутри молекулы перераспределяется и первоначально «низкоэргичная» $P-O-P$ превращается в $\sim P$, которая затем передается другим молекулам, например АТФ, и производит биологическое действие. Ферментация в сущности представляет серию реакций группового переноса, относящихся к области классической химии; генерированная же энергия является связанной энергией.

В отличие от этого биологическое окисление представляет использование термодинамического потенциала между Н и О. Здесь мы должны предположить, что в этом процессе играет роль E^* , т. е. что энергия высвобождается и переносится в определенные точки в форме электронного возбуждения. Мы уже ранее пришли к заключению, что эти электронные возбуждения имеют специфическую форму, возможную лишь в тех водных структурах, которые протоплазма порождает вокруг себя. Такой формой являются триплетные состояния электронов. Мы уже видели также, что роль кислорода не ограничивается его действием в качестве конечного акцептора электронов и что кислород, возмущая электромагнитное поле, сильно влияет на реактивность, т. е. на вероятности переходов в одном из центральных членов окислительной цепи. Вероятность переходов между триплетными и синглетными состояниями сильно зависит от возмущений электромагнитного поля и, следовательно, от возмущений, вызванных O_2 . Но триплеты сами по себе также вызывают такое возмущение, которое, как можно ожидать, влияет на образование и реакции других триплетов. Таким образом, в основе аэробной жизни клетки лежит возмущенное электромагнитное поле, и это возмущение, возможно, является одним из наиболее важных параметров в биологии.

Это приводит нас к интересной взаимосвязи между ферментацией и окислением, обычно называемой «эффектом Пастера». Под этим подразумевается определенная взаимосвязь двух процессов, классический пример которой представляют дрожжи. В анаэробных условиях дрожжи живут за счет ферментации, в присутствии же кислорода они переключаются на окисление. Механизм этого «переключения»

очень занимал биохимиков, и для его объяснения было предложено много теорий. Наши соображения выдвигают новую и, быть может, наиболее простую теорию. Если кислород одним лишь своим присутствием изменяет реактивность центрального катализатора, такого, как рибофлавин, и делает возможным новые электронные переходы, то вполне возможно, что в его присутствии химические события идут по новому пути, причем первичное действие производится магнитным возмущением, вызванным парамагнитной молекулой O_2 . Ни одно из веществ, кроме рибофлавина, не проявляло подобного поведения по отношению к кислороду. Следовательно, это поведение специфично, и резонно предположить, что оно имеет свое биологическое значение, а не является случайным.

Другим загадочным взаимоотношением является взаимоотношение патологического роста с ферментацией и окислением. Как известно из классических работ О. Варбурга, раковые клетки живут за счет ферментации в большей степени, чем нормальные, и Варбург приписывает этому изменению первичную роль в генезисе рака. Если окисление и ферментация представляют собой всего лишь два альтернативных способа производства энергии, то непонятно, почему сдвиг баланса этих двух процессов в сторону ферментации должен вести к патологическому росту.

Соображения, представленные в этой книге, подсказывают объяснение. Если энергия электронного возбуждения играет важную роль в биологических процессах передачи энергии и если различные биологические процессы действительно управляются энергией триплетных возбужденных состояний, то события будут в большой степени зависеть от возмущения электромагнитного поля; это возмущение вызывается кислородом, а также триплетами, образовавшимися под его первоначальным действием. Следовательно, аэробная жизнь означает качественно иной тип жизни, основой которого является возмущенное электромагнитное поле, а инструментом — триплетные возбужденные состояния. Варбург неоднократно подчеркивал значение структуры, так как окисление связано со структурой, ферментация же от нее не зависит. Вместо «структуры» мы можем также применять слово «твердое состояние», под которым физик подразумевает упорядоченное состояние

с некоторой периодичностью. В этой книге мы расширили это понятие структуры и упорядоченности, кроме белков и белково-липидных комплексов, также на воду и показали, что обе эти структуры образуют одну-единую систему. Вполне возможно, что только структуры могут создавать структуры, т. е. только структура, с которой связано окисление, может образовывать вокруг себя обширные водные структуры, дополняющие ее. Создающиеся таким образом водные структуры играют основную роль в управлении возбужденными электронами и, следовательно, как можно ожидать, играют также основную роль в процессах передачи энергии между окислением и системами, которые приводятся в действие его энергией. Есть основания предполагать или нет оснований исключать возможность того, что существует и более тесная связь между окислением и биологическими функциями, чем связь через $\sim P$, и вполне возможно, что энергия окисления не обязательно аккумулируется в $\sim P$, прежде чем она может быть использована клеткой. Возможно, что биологическая система сопряжена с окислением и использует его энергию возбуждения более непосредственно! Внезапное прекращение деятельности центральной нервной системы при удалении кислорода или отравлении его активатора цианидом говорит в пользу наличия таких непосредственных связей. Следовательно, если энергия триплетного возбуждения используется также для поддержания системы структур, которая генерирует эти возбуждения, то любое нарушение должно вести к нарушению всей системы и распаду структуры по порочному кругу.

Таким образом, ферментация и окисление — это не просто два альтернативных пути производства энергии, а два различных способа жизни. Ферментация, к которой прибегает клетка в анаэробных условиях, основана на реакциях группового переноса, которые не нуждаются ни в каких бы то ни было структурах, будь то структуры воды или твердого вещества, ни в возмущенном электромагнитном поле. Для второго способа жизни, аэробного, необходима упорядоченность как твердого вещества, так и воды, и его основой является возмущенное электромагнитное поле *).

*) Было бы интересно измерить магнитную восприимчивость аэробных, живых и дышащих, клеток и сравнить ее с восприимчивостью

Резонно предположить, что триплетные возбуждения и передача энергии, которые предполагают упорядоченную структуру, играют роль не только в окислении, но также и в самых разнообразных биологических функциях и их регуляции и, следовательно, нуждаются не только в структуре и порядке, но и в возмущенном электромагнитном поле, которое устанавливается окислением и возникающими под первичным воздействием O_2 триплетами. К таким функциям может относиться и клеточное деление, упорядоченный митотический путь которого обусловлен порядком, структурностью биологического субъекта и всеми теми его особенностями, которые с ним связаны.

Если смотреть на рак и его связь с окислением и ферментацией с этой точки зрения, то многое делается более ясным. Так, если прекратить на долгое время подачу кислорода к тканям высших животных, то наступает смерть. Однако если подачу O_2 прекращать периодически, как в экспериментах Камерона и Гольдבלата, и восстанавливать ее до наступления смерти, то мы можем ожидать, что не только будет дезорганизована окислительная система, но что наступит также перерождение всех тех высших функций и регуляций, которые требуют для своего функционирования и энергетики структуры и возмущенного электромагнитного поля. Клетка должна возвратиться при этом к более примитивному способу жизни с его более низким уровнем организации, который не зависит от упорядоченных структур и не имеет тонкой регуляции. Поэтому одной из харак-

анаэробных, а также мертвых клеток. Если предположения, содержащиеся в этой главе, правильны, то первые должны оказаться слегка парамагнитными, не считая парамагнетизма, вызванного присутствующим O_2 , тогда как вторые должны оказаться диамагнетиками. Сдвиг в сторону диамагнетизма должен наблюдаться и в раковых клетках.

Диэлектрическая постоянная раковой ткани должна проявлять меньшую зависимость от частоты, чем диэлектрическая постоянная нормальной ткани, так как раковые клетки имеют более низкую степень организации, а вместе с этим и меньшую степень структурности воды.

Замороженный анаэробный раствор рибофлавина, помещенный в магнитное поле порядка 2000 э, не излучает света при освещении. Таким образом, излучение в присутствии кислорода вызывается не просто статическим возмущением поля, а более глубоким взаимодействием между молекулами O_2 и возбужденным рибофлавином.

терных черт такой клетки будет неограниченная способность размножаться (как в дрожжах), и для своего энергоснабжения она сможет обойтись одной только ферментацией.

20. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

После того, как на протяжении девятнадцати параграфов мы погружались в детали отдельных процессов, мы можем в заключение всплыть на поверхность, с тем чтобы осмотреться, сориентироваться и спросить: к чему же все это?

Если мы вернемся назад к нашей отправной точке, к «*chiaroscuro*», то очертания его покажутся нам теперь несколько более ясными. Биохимия не является замкнутой в себе наукой. Успех ее зависит от прогресса в других областях знания, в первую очередь в чистой химии. В истории этой науки имеются два четко различимых периода. Первый провозглашен Лукрецием и Эпикуром, которые проповедовали, что материя построена из малых неделимых единиц, атомов. Основное, что сделала химия за последние два тысячелетия, — это определила количество различных сортов атомов (около сотни), выделила их, назвала и установила пути и формы их связей друг с другом. Различные атомы были обозначены буквами, их связи — черточками, так что с помощью букв и черточек мы можем написать на бумаге символы, которые дают достаточно ясную картину структуры сложных молекул.

Биохимия, следуя по стопам химии, прослеживая различные атомы и связи сквозь лабиринт биологических реакций, значительно преуспела в анализировании структур и реакций, которые могут быть описаны в этих терминах и символах в виде сочетаний буква—черта—буква (например, $R-O-R$).

Следующий этап в истории химии начался в 1913 г., когда Бор создал представление об электронных орбитах в атомах и молекулах. Теория созрела к 1927 г., когда было установлено волновое уравнение Шредингера. В этой теории атом уже более не является неделимой единицей, а представляет собой облако электронов, или, точнее, облако вероятности плотностей электронов. Молекула представляет гроздь таких облаков фантастической и изменчивой формы.

С этими облаками может происходить большое число различных изменений, но все они записываются одним и тем же символом буква—черта—буква, который, следовательно, уже не адекватен для их описания. Биологические явления, возможно, в значительной степени являются проявлением таких более тонких изменений, которые происходят в областях, неизвестных классической химии. Они относятся к области квантовой механики и могут быть описаны лишь на ее языке.

Биохимия, однако, все еще не признает важности этого прогресса или лишь в малой степени проявляет спорадический интерес к нему. Она все еще продолжает быть наукой Лукреция или Эпикура: буква — черта — буква. Именно поэтому она не достигла успеха в анализе тех реакций, которые не могут быть описаны этими символами. Отсюда «*oscuro*» биохимического «*chiaroscuro*».

Это не упрек биохимикам. Автор провел около полугода в Принстонском институте развития науки (Institute for Advanced Studies), пользуясь безграничным гостеприимством этого замечательного учреждения. Он надеялся, что, общаясь с теми, кто знал многое об электронах, он найдет помощь в лучшем понимании биологических явлений. Он встретил глубокий и сочувственный интерес к биологии. Однако, когда обнаружилось, что живая система содержит более чем два электрона, физики в ужасе повернулись к нему спиной, так как математические трудности оказались непреодолимыми.

Согласно лукрецианской биохимии, между молекулами не происходит взаимодействия без непосредственного их соприкосновения. В этой книге поддерживается идея, что многообразные взаимодействия могут происходить без такого вещественного контакта, либо посредством энергетических связей, либо посредством электромагнитного поля, которое, таким образом, вместе с водой и ее структурами представляется матрицей биологических реакций.

В соответствии с основными принципами лукрецианской химии биология рассматривает молекулы и их агрегаты как изолированные единицы, разделенные водой, которая заполняет пространство между ними. Приведенный в этой книге материал говорит о том, что значение воды не ограничено этим: она является частью самой живой материи.

Одной из главных функций протоплазматических структур, возможно, является создание в воде специфических структур, которые делают возможным такие формы электронного возбуждения и проведения энергии, которые были бы невозможны вне этих структур. Твердое вещество и вода клетки совместно образуют единую систему, которая обладает странным свойством — быть живой.

Я не сомневаюсь в том, что наш век будет свидетелем глубокой революции в развитии биологии, установления квантовомеханической биохимии, построенной над зданием лукрецианской биохимии. Данная книга, — возможно, лишь первая ласточка этой весны.

Биолог, рискующий вступить в эту область, должен иметь в виду, что он допустит много ошибок, так как многие из его интерпретаций окажутся в дальнейшем неверными. Он может лишь надеяться на то, что в приоткрытую дверь за ним последуют исследователи, более квалифицированные в решении квантовомеханических проблем, которые смогут установить многие его ошибки. Единственным вознаграждением его будет лишь беглый взгляд на биохимию будущего, с высоты которой символы буква—черта—буква будут, выглядеть лишь как скелеты, говорящие нам о действительной природе жизни не больше, чем ископаемые кости динозавра говорят о рефлексх и половых отношениях этих животных.

ЛИТЕРАТУРА

- W. D. Alexander and K. W. M. Johnson, *Nature* **178**, 259 (1956).
- W. Arnold and J. B. Davidson, *J. Gen. Physiol.* **37**, 677 (1954).
- W. Arnold and E. S. Meek, *Arch. Biochem. and Biophys.* **60**, 82 (1956).
- W. Arnold and J. R. Oppenheimer, *J. Gen. Physiol.* **33**, 423 (1950).
- D. I. Arnon, *Science* **122**, 9 (1955).
- D. I. Arnon, M. B. Allen and F. R. Whately, *Nature* **174**, 394 (1954).
- T. T. Bannister, *Arch. Biochem. and Biophys.* **49**, 222 (1954).
- J. M. Barnes and J. I. Duff, *J. Physiol. (London)* **124**, 37 (1954).
- R. S. Becker and M. Kasha, *The Luminescence of Biological Systems* (под ред. F. H. Johnson), p. 25. AAAS, Washington, D. C., 1955.
- M. Berger, H. J. Stecker and H. Waelsch, *Nature* **177**, 1234 (1956).
- J. D. Bernal and R. H. Fowler, *J. Chem. Phys.* **1**, 515 (1933).
- M. Borbiero and A. Szent-Györgyi, *Biol. Bull.* **96**, 162 (1949).
- P. W. Bridgman, *The Physics of High Pressure*, G. Bell and Sons, London, 1949.
- G. L. Brown and A. M. Harvey, *Brain* **62**, 341 (1939).
- N. L. R. Bucher, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **63**, 204 (1941).
- T. Bucher and J. Kaspers, *Biochim. et biophys. Acta* **1**, 21 (1947).
- F. Buchthal and S. Clemmesen, *Acta Psychiat. Neurol.* **16**, 389 (1941).
- G. O. Burr and M. M. Burr, *J. Biol. Chem.* **86**, 587 (1930).
- A. M. Buswell and W. H. Rodenbush, *Sci. American* **194**, 476 (1956).
- I. Chao, *J. Cellular Comp. Physiol.* **6**, 1 (1935).
- G. H. A. Clowes and M. E. Krah1, *J. Gen. Physiol.* **20**, 145 (1936).
- L. N. M. Duysens, *Transfer of Excitation Energy in Photosynthesis*, диссертация, Utrecht, 1952.
- C. Dhéré and V. Gastelli, *Compt. rend.* **206**, 2003 (1938).
- P. Debye and J. O. Edwards, *Science* **116**, 143 (1952).
- D. D. Eley, G. D. Pafitt, M. J. Perry and D. H. Taysum, *Trans. Faraday Soc.* **49**, 79 (1953).
- M. G. Evans and J. Gergely, *Biochim. et biophys. acta* **3**, 188 (1949).
- C. Eyzaguirre, C. B. P. Folk, K. L. Zierler and J. L. Lilienthal, *Amer. J. Physiol.* **155**, 69 (1948).
- F. S. Feates and D. J. G. Ives, *J. Chem. Soc.*, 2798 (1956).
- T. Förster, *Fluoreszenz Organischer Verbindungen*, Vandenhoeck and Ruprecht, Göttingen, 1951.
- H. S. Frank and M. W. Evans, *J. Chem. Phys.* **13**, 507 (1945).
- J. H. Gaddum, *Lectures on the Scientific Basis of Medicine*, 1954—1955 (British Postgraduate Medical Federation), vol. 4, p. 238, Athlone Press, London, 1956.
- J. Gergely, *Federation Proc.* **9**, 176 (1950); **10**, 188 (1951).
- J. Gergely, *J. Biol. Chem.* **200**, 543 (1953).
- H. Goldblatt and G. Cameron, *J. Exptl. Med.* **97**, 525 (1953).
- F. Gundernatsch, *Entwicklung und Wachstum*, *Handbuch der inneren Sekretion* (под ред. M. Hirsch), vol. 2, p. 1493, 1929.
- F. Gundernatsch, *Gold. Spring Harbor Symposia Quant. Biol.* **2**, 94 (1934).
- F. Gundernatsch, *Med. Record* **146**, 101 (1937).
- S. Hajdu and A. Szent-Györgyi, *Amer. J. Physiol.* **168**, 159, 171 (1952).
- S. Hajdu and A. Szent-Györgyi, *Enzymologia* **16**, 392 (1954).
- J. A. Hammar, *Kgl. Vetenskapsg. Soc. Arsbok*, p. 33, 1938.
- J. W. Harms, *Z. Naturforsch.* **7**, 622 (1952); **8**, 384 (1953).
- J. C. Henniker and J. W. McBain, *The Depth of a Surface Zone of a Liquid*, Technical Report № 6, ori 154, T. O. 11, Stanford Research Institute, Stanford, Calif., 1948.
- C. Herbst, *Arch. Entwicklungsmech. Organ.* **2**, 455 (1895); **7**, 424 (1900).
- C. Herbst, *Mitt. Zool. St. Neapel* **11**, 193 (1936).
- A. V. Hill and L. Macpersen, *Proc. Roy. Soc.* **B143**, 81 (1954).
- F. G. Hopkins, *Biochem. J.* **15**, 286 (1921).
- F. G. Hopkins, *J. Biol. Chem.* **84**, 269 (1929).
- B. Jacobson, *Nature* **172**, 666 (1953).
- B. Jacobson, *J. Amer. Chem. Soc.* **77**, 2919 (1955).
- B. Jacobson, W. A. Anderson and J. T. Arnold, *Nature* **173**, 772 (1954).
- H. P. Jenerik and R. W. Gerard, *J. Cellular Comp. Physiol.* **42**, 79 (1953).
- J. G. Y. de Jong, *Dystrophia myotonica, Papamyotonica and Myotonia Congenita*, диссертация, Utrecht, 1955.
- A. J. Kahn and A. Sadow, *Science* **112**, 647 (1950).
- M. Kasha, *Discussions Faraday Soc.* № 9, 14 (1950).
- M. Kasha, *J. Amer. Chem. Soc.* **20**, 71 (1952).
- M. Kasha and S. P. McGlynn, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **7** (1956).
- H. G. Klemperer, *Biochem. J.* **60**, 122, 128 (1955).
- M. E. Krah1 and G. H. A. Clowes, *J. Gen. Physiol.* **20**, 173 (1936).

- M. E. Krahll and G. H. A. Clowes, *J. Cellular Comp. Physiol.* **11**, 1, 21 (1938).
 K. Laki and W. R. Carroll, *Nature* **175**, 389 (1955).
 M. A. Lauffer and A. G. Szent-Györgyi, *Arch. Biochem. and Biophys.* **56**, 542. (1955).
 H. W. Levenenz, *Luminescence of Solids*, J. Wiley, New York, 1950.
 G. N. Lewis and M. Kasha, *J. Amer. Chem. Soc.* **66**, 2100 (1944); **67**, 944 (1945).
 G. N. Lewis and M. Calvin, *J. Amer. Chem. Soc.* **67**, 1232 (1945).
 M. R. Lewis and P. P. Golland, *Amer. J. Med. Sci.* **215** (1946).
 G. Ling and R. W. Gerard, *J. Cellular Comp. Physiol.* **34**, 413 (1949).
 F. Lipmann and C. D. Du Toit, *Science* **113**, 474 (1951).
 W. F. Loomis and F. Lipmann, *J. Biol. Chem.* **173**, 807 (1948).
 W. A. Loewenstein and A. Szent-Györgyi, *J. Cellular Comp. Physiol.* **46**, 345 (1955).
 H. L. Lundgren and C. H. Ninkley, *J. Polymer Sci.* **14**, 139 (1945).
 J. McLaughlin, G. Schiffman and A. Szent-Györgyi, *Biochim et biophys. acta* **17**, 160 (1955).
 J. McLaughlin and A. Szent-Györgyi, *Enzymologia* **16**, 384 (1954).
 H. L. McMurray and R. S. Mulliken, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.)* **26**, 312 (1940).
 C. Martius and B. Hess, *Arch. Biochem. and Biophys.* **33**, 486 (1951).
 C. Martius, *Die Wirkungsweise des Schilddrüsenhormones*, Colloq. Deut. Ges. Physiol. Chem. Mosbach. Baden, 1945.
 M. Middlebrook, *Enzymologia* (в печати).
 M. Middlebrook and A. Szent-Györgyi, *Biochim. et biophys. acta* **18**, 407 (1955).
 E. Mihalyi, *J. Biol. Chem.* **201**, 197 (1953).
 E. Mihalyi and A. G. Szent-Györgyi, *J. Biol. Chem.* **201**, 189, 211 (1953).
 L. S. Palmer, A. Cunliffe and J. M. Hagh, *Nature* **170**, 796 (1952).
 S. V. Perry, *Biochem. J.* **78**, 251 (1951).
 J. A. Pople, *Proc. Roy. Soc.* **A202**, 323 (1950); **A205**, 163 (1951).
 P. Pringsheim, *Fluorescence and Phosphorescence*, Interscience, New York, 1949. (Есть русский перевод, ИЛ, 1951).
 J. M. Ritchie, *J. Physiol. (London)* **126**, 155 (1954).
 E. Shaw and D. W. Woolley, *Science* **124**, 121 (1956).
 V. G. Shore and A. B. Pardee, *Arch. Biochem. and Biophys.* **62**, 355 (1956).
 E. L. Smith, *Advances in Enzymol.* **12**, 191 (1951).
 M. J. Smith and S. W. Jeffrey, *Nature* **178**, 310 (1956).
 D. Spiro, *Exptl. Cellular Research* **10**, 562 (1956).
 B. L. Strehler and W. Arnold, *J. Gen. Physiol.* **34**, 809 (1951).

- A. Szent-Györgyi, *Nature* **157**, 875 (1946).
 A. Szent-Györgyi, *The Chemistry of Muscular Contraction*, Academic Press, New York, 1947.
 A. Szent-Györgyi, *Biol. Bull.* **96**, 140 (1949).
 A. Szent-Györgyi, *Biochim. et biophys. acta* **16**, 169 (1955).
 A. Szent-Györgyi, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **61**, 732 (1955).
 A. G. Szent-Györgyi, *Arch. Biochem. and Biophys.* **31**, 97 (1951).
 A. G. Szent-Györgyi and M. Borbiero, *Arch. Biochem. and Biophys.* **60**, 180 (1956).
 L. Varga, *Enzymologia* **14**, 212 (1950).
 O. Warburg, *Science* **123**, 307 (1956).
 J. D. Watson and F. H. Crick, *Nature* **171**, 737 (1953).
 D. W. Woolley and E. N. Shaw, *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 2948 (1952).
 D. W. Woolley and E. N. Shaw, *Science* **124**, 34 (1956).

Альберт Сент-Дьердьи

БИОЭНЕРГЕТИКА

Редактор *А. И. Костиенко*

Техн. редактор *Е. А. Ермакова*

Корректор *Т. С. Плетнева*

Сдано в набор 13/XI 1959 г. Подписано к печати 5/IV 1960 г. Бумага $84 \times 108^{1/32}$. Физ. печ. л. 4.875. Условн. печ. л. 8.0. Уч.-изд. л. 8.19. Тираж 10 000 экз. Т-01069. Заказ № 1992. Цена книги 4 руб. 10 коп.

Государственное издательство
физико-математической литературы.
Москва, В-71, Ленинский проспект, 15.

Ленинградский Совет народного хозяйства.
Управление полиграфической промышленности.
Типография № 1 «Печатный Двор»
имени А. М. Горького. Ленинград,
Гатчинская, 26.

Copyright © San'ky incorporation
derevyaha + Q