
Интернет-магазин
MAHES

<http://shop.rcd.ru>

- физика
- математика
- биология
- нефтегазовые технологии

Аксенов С. И.

Вода и ее роль в регуляции биологических процессов. — Москва-Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2004, 212 стр.

Рассматриваются особенности и механизмы воздействия воды, определяющие ее роль в регуляции метаболических процессов на различных уровнях организации биологических систем — макромолекулярном, мембранном и клеточном. Обсуждается влияние воды на динамику биологических структур в связи с их функцией и эффективностью процессов, в том числе процессов фотосинтеза, а также механизмы влияния состояния воды и ионов кальция на регуляцию метаболизма на клеточном уровне, механизмы чувствительности клеточных процессов к слабым воздействиям, в том числе, ЭМП низкой частоты, связь между регуляцией и устойчивостью биологических систем и другие вопросы роли воды.

Features and mechanisms of influence of water are considered which determine its role in the regulation of metabolic processes on different levels of organization of biological systems — macromolecular, membrane and cellular. Influence of water on the dynamics of biological structures in relation to their function and efficiency of processes including the processes of photosynthesis. Mechanisms of influence of state of water and calcium ions on the regulation of metabolism on cellular level, mechanisms of sensitivities of cellular processes to weak influences including low frequency EMF, the relation between regulation and stability of biological systems and other problems of role of water are discussed too.

ISBN 5-93972-306-3

© С. И. Аксенов, 2004

© Институт компьютерных исследований, 2004

<http://rcd.ru>

<http://ics.org.ru>

Оглавление

Предисловие	8
Введение	10
ГЛАВА 1. Особенности структуры воды и ее состояния в дисперсных системах	13
1.1. Особенности структуры и свойств воды	13
1.2. Состояние воды в гетерогенных (дисперсных) системах (по данным различных физических методов)	17
1.3. Об интерпретации результатов физических методов в исследовании состояния воды в биологических системах	21
1.4. Состояние воды в биологических системах по данным метода ЯМР	24
1.5. Заключение	28
ГЛАВА 2. Особенности пространственной структуры глобулярных белков и влияние на нее воды	30
2.1. Проблема связи между структурой и функцией белков	30
2.2. Особенности структуры белков и их устойчивости	32
2.3. О двойственном характере воздействия воды на структуру белков	35
2.4. Влияние воды на равновесие сил в пределах белковых макромолекул	39
2.5. Вода внутри белковых макромолекул	41
2.6. О самоорганизации и стабильности структуры белков в воде	44
ГЛАВА 3. Динамическая структура глобулярных белков и ее связь с функциональными характеристиками белков	48
3.1. Введение	48
3.2. Динамическая структура белков и методы ее изучения	49
3.3. Метод ЯМР в исследовании динамики белков	52
3.4. Исследование динамики белков методом спинного эха ЯМР	55
3.5. Заключение	66

ГЛАВА 4. Влияние воды на динамические и некоторые функциональные характеристики биологических мембран	69
4.1. Введение	69
4.2. Влияние воды на структуру, динамику и функцию фотосинтетических мембран	70
4.2.1. Особенности гидратации фотосинтетических мембран	72
4.2.2. Особенности влияния гидратации на динамику и функцию фотосинтетических мембран	75
4.3. Сложный характер динамики биологически активных веществ в мембранах	86
ГЛАВА 5. Роль воды в регуляции биологических процессов на клеточном уровне	91
5.1. Постановка задачи	91
5.2. Роль динамики белков в регуляции процессов на клеточном уровне	93
5.3. О регуляторной роли ионов кальция в клеточных процессах	95
5.4. Об эффектах «динамики живой протоплазмы»	97
5.5. Сорбция–десорбция белков как фактор регуляции активности в клетке	99
5.6. О роли состояния воды в клетке	102
5.7. Заключение	105
ГЛАВА 6. Состояние воды и биологическая активность (по данным исследований на семенах растений)	108
6.1. Введение	108
6.2. Состояние воды и ее распределение в семенах пшеницы на начальных этапах их прорастания	109
6.3. Особенности водного режима семян растений в процессе их созревания	117
ГЛАВА 7. Эффекты и механизмы чувствительности метаболических процессов к слабым воздействиям (на примере чувствительности к ЭМП низких частот)	124
7.1. Введение	124
7.2. Постановка задачи	126
7.3. Влияние ЭМП-обработки на активацию эстераз	129
7.4. Влияние ЭМП обработки на изменение pH у зародыша семян пшеницы	133
7.5. Особенности эффектов ЭМП на разных стадиях прорастания семян пшеницы	138
7.6. Эффекты ЭМП-обработки семян пшеницы при их набухании в растворах сахарозы с различным осмотическим давлением	143
7.7. Влияние длительного воздействия ЭМП на прорастание семян пшеницы	146

7.8. Обсуждение	149
7.9. Заключение	152
ГЛАВА 8. Влияние замораживания и высушивания на биологические структуры	157
8.1. Введение	157
8.2. Эффекты на макромолекулярном уровне	158
8.3. Эффекты на мембранном уровне	160
8.4. Эффекты на клеточном уровне	167
ГЛАВА 9. Процессы регуляции и надежность биологических систем	171
9.1. Введение	171
9.2. Процессы регуляции и особенности биосинтеза белков	172
9.3. О динамическом характере устойчивости ДНК	173
9.4. О двойственной роли иммунной системы	176
9.5. Об эффектах клонирования	177
9.6. О «нейтралистской» теории эволюции	180
Заключение	184
Литература	188

Предисловие

Несмотря на огромное число работ, посвященных структуре воды и особенностям ее воздействия на процессы формирования, стабилизации и активного функционирования различных биологических структур, указанная проблема и в настоящее время еще остается предметом дискуссии. Данный факт уже сам по себе вызывает вопросы, особенно на фоне достижений молекулярной биологии по расшифровке значительно более сложных структур и по выяснению механизмов их действия. Однако в случае воды существуют определенные специфические трудности, которые обусловлены многосторонним характером ее воздействия на биологические системы. Помимо сложности структуры самой воды здесь необходимо учитывать тот факт, что структура воды практически всегда изменяется при взаимодействии и даже при простом контакте с другими системами, причем это, в свою очередь, влияет и на состояние подобных систем. Многосторонний характер воздействия воды определяется не только такими факторами, как гидратация полярных групп и наличие гидрофобных эффектов, но и возможностью внедрения молекул воды в водородные связи внутри макромолекул и в мембранах, различием диэлектрических свойств у свободной и связанной воды, эффектами рН и ионной силы в водной среде и т. д. И как результат всех перечисленных воздействий, в том числе, разнонаправленного характера, вода фактически определяет равновесие сил в пределах биологических структур. А это является важным условием для участия данных структур в регуляции биологических процессов. С равновесием сил связано также появление динамической структуры биополимеров и мембран, что определяет еще одну сторону влияния воды — значительную роль энтропийных эффектов из-за изменения большого числа степеней свободы в случае взаимодействия данных структур между собой и с возможностью заметного снижения свободной энергии для прохождения таких процессов.

Вместе с тем, при изучении воды приходится учитывать, что равновесие сил достигается в условиях, когда общая энергия сил притяжения и отталкивания в пределах белковых макромолекул составляет порядка 10^6 ккал/моль при изменении свободной энергии при денатурации белков в воде примерно лишь на 10 ккал/моль [337, 251]. Следовательно, здесь имеется определенный знакопеременный ряд, где выделение малой

разностной величины на основе изучения вклада каждого из компонентов по отдельности представляется достаточно сложной задачей. Это относится, в том числе, и к выделению вклада в общую энергию от эффектов воды разного знака. В результате изучение воды как отдельного компонента биологических систем становится малоэффективным.

Указанные соображения приводят к выводу о необходимости использования других подходов, которые должны быть основаны на изучении воды непосредственно в составе биологических систем. Но в этом случае для выделения вклада от каждого из возможных эффектов воды необходимо иметь соответствующее число независимых параметров. Подобная задача, учитывая число факторов воздействия со стороны воды, не может быть решена на основе изучения лишь отдельных биологических структур. Здесь необходимы исследования на различных уровнях организации биологических систем — макромолекулярном, мембранном и клеточном, а также на модельных системах. Особое значение приобретает также сопоставление полученных результатов между собой и с динамическими и функциональными характеристиками изучаемых структур как наиболее чувствительными показателями изменений, возникающих при воздействии воды. Более того, принимая во внимание, что все такие структуры не существуют самостоятельно, становится необходимым рассмотрение более широкого круга вопросов, связанных с обеспечением устойчивости различных биологических структур, тем более, что в данном случае она имеет парадоксальный характер. При этом устойчивость достигается не повышением прочности структур, а наоборот, ее снижением в присутствии воды, что делает систему регулируемой и способной к выполнению своих функций, включая обеспечение процессов репарации и воспроизводства. Отдельной задачей является также выяснение роли воды в чувствительности живых систем к различным слабым воздействиям — область, которой придается особое значение в связи с проблемами экологии и медицины и где выполнено множество работ, далеко не всегда имеющих строго научный характер.

Рассмотрению указанных вопросов, включая выяснение механизмов воздействия воды на структурно-динамические и функциональные характеристики биологических структур, и посвящена настоящая книга. В число ее задач, учитывая наличие обширной и весьма противоречивой информации в данной области исследований, входит также анализ вероятных причин наблюдаемых расхождений.

В книге, по сравнению с прежним изданием [16], расширен круг обсуждаемых тем, и она дополнена полученными в последние годы материалами.

Введение

Проблема воды и особенностей ее воздействия на различные биологические структуры и процессы уже многие десятилетия привлекает постоянное внимание со стороны физиков, химиков и биологов. Интерес к этой проблеме определяется, прежде всего, уникальным значением воды в биологических системах, где вода наряду с белками и нуклеиновыми кислотами выступает в качестве их обязательной составляющей, а также неперенного участника практически всех биологических процессов. Уникальность роли воды, согласно существующим представлениям, проявляется не только в том, что вода служит специфической средой для прохождения биологических реакций, но и в том, что она непосредственно воздействует на формирование и стабилизацию нативной структуры макромолекул биополимеров, биологических мембран и различных более сложных надмолекулярных образований [309, 351, 77, 232, 94, 95, 270]. Предполагается также, что вода непосредственно влияет и на эффективность биологических реакций, причем результирующее изменение конформации белков и свободной энергии системы связано с одновременным изменением структуры и водного компонента (изменением состояния воды) [156, 93, 152, 324]. Существенная роль состояния воды в биологических процессах еще ранее обсуждалась физиологами растений [162, 59, 109]. В литературе рассматривают и другие биологические эффекты, которые относят к изменению состояния воды при различных способах ее обработки и т. д. [192, 172, 87, 121, 295, 294].

Вместе с тем имеется множество данных, которые можно рассматривать как явно противоречащие указанным представлениям. Количество воды с измененной структурой, определяемое с помощью самых различных физических методов, оказывается относительно небольшим [3, 4, 171, 214, 236, 126, 316, 301]. Более того, оно мало меняется даже после денатурации белков [316, 184, 170], хотя влияние денатурации на конформацию белков многократно превышает ее ожидаемое изменение в ходе биологических процессов. Регистрация столь малых эффектов ставит под вопрос и представления физиологов. Со стабилизирующей ролью воды, очевидно, не согласуется общеизвестный факт большей стабильности белков в сухом, а не во влажном состоянии.

На уменьшение прочности структуры белков в воде указывают и многочисленные данные по появлению внутреннего движения в макромолекулах белков в присутствии воды [157, 80, 12, 15, 225, 226, 296, 306]. Кроме того, ряд авторов отмечает, что воздействия со стороны воды далеко не достаточно для стабилизации структуры белков [351, 270], причем отсутствует корреляция между фактором гидрофобности и термостабильностью белков [301, 299, 351], и даже высказываются сомнения в возможности заметного влияния гидрофобного взаимодействия на структуру белков [194]. Отмечаются и другие противоречия.

Указанные противоречия не всегда имеют реальную основу и, как будет показано далее, они отчасти обусловлены ограниченными возможностями использованных методов и их некорректной интерпретацией, а иногда и переоценкой ожидаемых эффектов. Но в целом они дают серьезные основания для пересмотра существующих представлений о стабилизирующей роли воды в биологических структурах, да и самого понятия стабильности (устойчивости), которое для биологических структур существенно отличается от обычно принятого.

Понятие устойчивости, как правило, связывают с химической стойкостью или прочностью различных структур. Это в общем справедливо для привычных нам макроскопических структур, где отдельные повреждения на молекулярном уровне не столь существенны при наличии у них определенного запаса прочности. Подобный подход применяют и к биологическим макромолекулам, функции которых, например, белков, безуспешно пытались связать с их наиболее стойкими структурными элементами. Однако макромолекулы биополимеров являются макросоединениями, но не макроскопическими структурами, и у них даже единичные повреждения или изменения, как правило, резко ухудшают или вообще делают невозможным выполнение ими своих функций. А такие изменения у биологических структур, не обладающих высокой стабильностью даже на уровне отдельных аминокислот в составе белков, не говоря уже о структурах в целом, не так уж редко возникают не только при действии различных видов радиации, но и под действием энергии теплового возбуждения уже при обычных температурах среды [114, 11].

Поэтому возможность сохранения конкретных биологических структур при таких температурах ограничена даже на исходном мономерном уровне, и жизнь, как известно, тем и отличается, что существование биологических структур, если исключить весьма маловероятные процессы, полностью зависит от их воспроизводства в процессах биосинтеза. Требования же к воспроизводству определяются необходимостью обеспечения избирательности биологических процессов и возможностью управления ими, что связано не с прочностью, а, наоборот, с чувствительностью участвующих практически во всех биологических процессах

белков к слабым воздействиям. Данные условия выполняются в водной среде, тогда как при ее отсутствии белки становятся более стабильными, но неспособными к выполнению своих функций.

Эти, да и другие данные, которые будут рассмотрены в дальнейшем, послужили основой для предположения о том, что вода, наряду с другими своими функциями, непосредственно участвует в регуляции биологических процессов, создавая предпосылки для их избирательности и возможности управления ими, причем не только на уровне макромолекул биополимеров, но и на мембранном, а также и на клеточном уровнях [253]. Представления о регуляторной роли воды в биологических системах, где вода участвует практически во всех известных процессах, связаны с необходимостью существенного пересмотра или уточнения многих важных для биологии положений. Поэтому в нашу задачу входит обсуждение широкого круга различных вопросов, начиная от особенностей структуры воды и ее состояния в модельных и биологических системах, влияния воды на структурно-динамические и функциональные характеристики белков и мембран, а также на клеточные процессы и кончая вопросами сохранения устойчивости биологических систем в условиях, когда каждая из отдельных биологических структур обладает лишь ограниченной стабильностью. Жизнь, по сути дела, представляет собой форму устойчивого существования неустойчивых структур, чья нестабильность еще более возрастает в присутствии воды. Но именно последний фактор, как это ни парадоксально, обеспечивает основу для длительного существования неустойчивых биологических структур.

ГЛАВА 1

Особенности структуры воды и ее состояния в дисперсных системах

1.1. Особенности структуры и свойств воды

Вода, как известно, отличается от других жидкостей по целому ряду аномальных свойств, обусловленных особенностями ее структуры, причем практически каждое из них имеет важнейшее биологическое значение. Эти особенности определяются не просто полярными свойствами молекул воды — последние выделяются среди прочих полярных молекул характером распределения электронной плотности. Каждая из молекул воды имеет 2 нескомпенсированных положительных заряда у атомов водорода и 2 отрицательных заряда из-за неподеленной p -электронной пары кислорода. Данные заряды расположены практически по углам тетраэдра (рис. 1), что позволяет молекулам воды образовывать 4 водородные связи с соседними молекулами воды с точным балансом числа донорных и акцепторных связей и с близкими к оптимальным для таких связей направлениями, т.е. практически с максимальной для них энергией [248, 63]. В то же время, например, молекулы спиртов образуют лишь единичные водородные связи, а молекула аммиака образует 3 донорные, но лишь одну акцепторную связь.

Благодаря отмеченным особенностям в воде может образоваться структура, в которой водородные связи молекул воды полностью замыкаются на соседние молекулы воды с выигрышем энергии сразу 4-х водородных связей. Это обуславливает выгодность образования рыхлой пространственной структуры с 4 ближайшими соседями для льда (рис. 2), в отличие от структур, определяемых ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями, где решающую роль играют эффекты плотной упаковки молекул [130]. Плотность льда ($0,91 \text{ г/см}^3$), а также и менее рыхлой воды ($1,00 \text{ г/см}^3$) почти вдвое ниже той, которую можно было бы ожидать при плотном расположении молекул воды друг около друга ($1,8 \text{ г/см}^3$) [248]. Наличие относительно прочного каркаса из молекул воды, связанных 4-мя водородными связями, обуславливает сравнительно высокую температуру замерзания воды, которая примерно на 100° выше ожидаемой

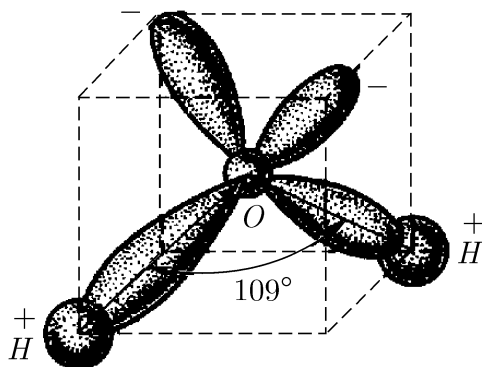


Рис. 1. Модель структуры молекулы воды

из сравнения с жидкостями одного с ней гомологического ряда. Основа такого каркаса сохраняется и после плавления льда, причем частичное нарушение рыхлой структуры при плавлении приводит к известной аномалии повышения плотности воды по сравнению со льдом. Еще одна аномалия — наличие максимума плотности воды при 4°С — связана с наличием эффектов разного знака: увеличения плотности воды из-за постепенного разрушения рыхлой структуры и уменьшения ее плотности за счет роста температуры. Затраты энергии на разрыв части водородных связей при плавлении льда определяют высокую теплоту его плавления (80 кал/г), а на разрыв других водородных связей при нагреве воды — высокую теплоемкость жидкой воды (1 кал/г·град.), которая вдвое превышает теплоемкость льда и пара (0,47 кал/г·град.). Наконец, разрыв большинства оставшихся водородных связей при переходе в парообразное состояние приводит к высокой теплоте парообразования для воды (539 кал/г) [248]. Со структурными особенностями воды связаны и такие ее характеристики, как высокая диэлектрическая постоянная, свойства полярного растворителя и т. д. Все они, как будет отмечено далее, имеют важнейшее биологическое значение.

Перечисленные выше свойства воды находятся в хорошем согласии с представлениями о частичном сохранении в жидком состоянии рыхлой структуры льда с 4-мя водородными связями между молекулами воды, что с теми или иными изменениями принимается в большинстве

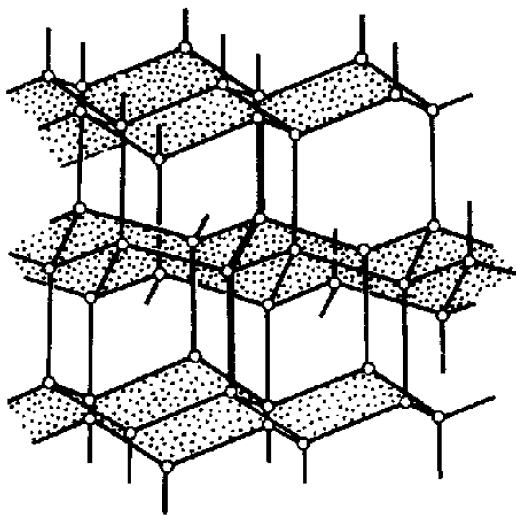


Рис. 2. Расположение центров молекул воды в структуре льда [248]

моделей жидкой воды [275, 274, 213, 248, 63]. Отмеченные выше свойства воды в основных чертах могут быть описаны при использовании минимального числа параметров — с помощью так называемых «двух-структурных» моделей. В них рассматривают эффекты либо наличия более плотно упакованных молекул воды между островками льдоподобной структуры (кластерами), либо внедрения молекул воды в ее пустоты (модель Самойлова [213]). Мы не будем здесь останавливаться на этих моделях — реальная структура воды, имея в своей основе структуру льда, по-видимому, должна включать большое число переходных элементов [274]. Последнее прямо следует из результатов компьютерного анализа структуры водных кластеров, включающих сотни молекул воды [163, 63], но их рассмотрение выходит за рамки настоящей работы. Нас больше интересует физическая картина явления, которая необходима для сопоставления эффектов, связанных с особенностями структуры воды и, особенно, ее изменением при взаимодействии с биологическими и другими системами.

Специфическая структура воды, сохраняющей участки, связанные 4-мя водородными связями, обуславливает и такую характерную для воды особенность, как существенное изменение ее структуры вблизи растворенных веществ или около границы с другим веществом в дис-

персных системах и даже вблизи краевой поверхности воды и льда. Как видно на рис. 2, структура, связанная 4-мя водородными связями, безгранична в пространстве и ее нельзя прервать, не нарушив соотношение водородных связей между соседними молекулами воды. Поэтому изменение структуры воды вблизи других структурных образований должно возникать не только за счет непосредственного взаимодействия полярных молекул воды с ионами, заряженными группами и т. д., но и вблизи любой другой границы. А там, где молекулы воды не могут замкнуть все 4 водородные связи, наряду с появлением молекул воды, образующих 3, 2 и менее водородных связей, должна происходить перестройка ее структуры. При этом вода, не способная образовывать 4 водородные связи с соседями, будет замерзать при более низких температурах по сравнению с водой в объеме — «объемной» водой. Следовательно, и здесь проявляется еще одна аномалия воды: вода, изменяющая свою структуру вблизи границы или вследствие взаимодействия с другим веществом, — «связанная» вода — обладает более высокой подвижностью по сравнению со свободной водой при температурах ниже 0°С, что полностью подтверждается экспериментальными данными. Пленка незамерзшей воды при температурах вплоть до нескольких десятков градусов ниже нуля зарегистрирована в различных дисперсных системах, в том числе около почвенных частиц, в порах цеолитов и т. д. [248], а в интервале около десяти градусов ниже нуля — вблизи чисто гидрофобной поверхности, а также непосредственно на границе льда [149].

Но для биологических систем важно не только изменение структуры воды вблизи поверхности раздела, сопровождаемое уменьшением доли молекул, связанных 4-мя водородными связями. Подобная перестройка вблизи неполярной поверхности энергетически невыгодна, что подтверждается данными по модельным системам — растворам неполярных углеводородов в воде. Неполярные углеводороды плохо растворимы в воде, причем, несмотря на уменьшение энтальпии системы, наблюдается значительная положительная свободная энергии растворения [213, 133, 173]. При растворении в воде регистрируют практически одинаковые значения теплоты гидратации для различных неполярных соединений, откуда следует, что изменение энергии связано не с каким-либо специфическим взаимодействием неполярных молекул с водой, а с перестройкой структуры самой воды. Модельные опыты показывают, что свободная энергия растворения неполярных углеводородов в воде намного больше, чем свободная энергия их растворения в любом органическом растворителе [173].

Невыгодность подобных структурных изменений для воды в пограничных областях, в свою очередь, порождает хорошо известную для мо-

дельных систем тенденцию к вытеснению неполярных соединений или групп из воды, их слипанию между собой и уменьшению поверхности контакта с ними [133, 248, 351, 63]. Именно этот фактор является источником так называемого гидрофобного взаимодействия, или, более строго, гидрофобных эффектов, которые, как предполагается, играют решающую роль в формировании нативной конформации биополимеров и в их стабилизации [309, 351, 270, 94, 95]. С ними связывают формирование компактной структуры белковой глобулы в воде, где на поверхности глобулы располагаются полярные группы, а неполярные вытеснены внутрь, с образованием там «гидрофобного ядра» [93, 95]. Гидрофобные эффекты влияют и на формирование структуры биологических мембран, различных надмолекулярных образований и т. д. [95, 125]. Наконец, эффекты сопряжения изменений структуры белков и воды обуславливают возможность непосредственного воздействия воды на эффективность биологических реакций [152, 93, 95, 156].

1.2. Состояние воды в гетерогенных (дисперсных) системах (по данным различных физических методов)

Исходя из изложенного, следовало ожидать, что участие воды во всех этих процессах должно отражаться на изменении как структуры указанных биологических систем, так и структуры водного компонента, т. е. на состоянии воды. Однако данное положение оказалось далеко не столь очевидным, как это первоначально предполагалось, особенно по отношению к белкам. Имеющиеся сведения по структуре глобулярных белков показывают, что распределение неполярных аминокислотных остатков в пределах белковой глобулы носит сложный характер, причем количество таких остатков на поверхности макромолекулы может превышать их число внутри глобулы [312, 328]. Кроме того, внутри макромолекул белков обнаруживают до десятков молекул воды [280, 310, 278]. Значительное влияние на их структуру оказывает и взаимодействие молекул воды с пептидными связями в пределах белковой цепи и т. д. На этом мы остановимся позднее. Показано также, что воздействие гидрофобных эффектов на структуру глобулярных белков, по-видимому, заметно меньше ожидавшегося и является лишь одним из факторов, способствующих стабилизации их нативной конформации [351, 194]. Наряду с этим далеко не решен и вопрос о состоянии воды в модельных и биологических системах, несмотря на огромное число посвященных данному вопросу работ и большое число использованных физических и физико-химических методов.

Хотя вода, казалось бы, представляет собой существенно более простую систему по сравнению со структурой макромолекул биополимеров и, тем более, различных надмолекулярных образований, методы ее изучения располагают лишь ограниченными возможностями. Они обусловлены, прежде всего, общими трудностями исследования структуры жидкостей, которые особенно возрастают в случае гетерогенных (дисперсных) систем. Фазовый переход в них, в соответствии с данными термодинамики малых систем [304], имеет плавный характер, что не позволяет, например, непосредственно использовать данные по постепенному вымерзанию или плавлению воды в биологических объектах как показатель ее состояния. Значительные затруднения вызывает и воздействие обменных процессов, которые происходят как между молекулами воды в различных состояниях, так и между протонами воды и отдельных молекулярных групп, входящих в состав биологических структур. Подобный обмен приводит к общему усреднению наблюдаемой картины и размыванию ее деталей.

Существенно ограничены и возможности физических методов, используемых для изучения состояния воды в биологических системах. Такие ограничения часто не учитываются при интерпретации их результатов. Сама интерпретация также не всегда является корректной и т. д. Все это делает необходимым критическое рассмотрение имеющихся данных по состоянию воды в модельных и биологических системах, полученных с помощью основных физических методов.

Данные этих методов позволили с достаточной определенностью решить, по-видимому, лишь один существенный вопрос: большая часть воды в биологических системах мало отличается по своим структурным характеристикам от обычной воды. Подобный вывод следует из совокупности результатов использования следующих методов: метода калориметрии [170, 171], инфракрасной спектроскопии [215, 336], диэлектрической спектроскопии [126, 301], спиновой метки [157], измерений химического сдвига [282], времен релаксации T_1 и T_2 для протонов воды [3, 323], частотной зависимости T_1 для протонов воды [303] характеристик самодиффузии воды [169], ЯМР измерений при отрицательных температурах [314, 316] и ряда других [214, 348]. Однако количественные оценки для связанной воды в модельных и биологических системах вызывают серьезные возражения, несмотря на то, что существует определенное сближение между результатами большинства из использованных физических методов.

Примерно одинаковые оценки количества связанной воды в растворах биополимеров (0,3–0,5 г/г веса биополимеров) дает использование методов калориметрии [170, 171], диэлектрометрии [126, 301], ЯМР-измерений при отрицательных температурах [316, 314]. Несколько более

низкие оценки были получены при исследовании процессов адсорбции воды на белках [184, 237]. Еще более низкие оценки — вплоть до 0,05–0,15 г/г веса белков и ДНК — были даны на основе анализа результатов метода спинного эха ЯМР [3, 323].

Ряд авторов сопоставляет полученные оценки с количеством воды в монослое около поверхности белков. Однако анализ структуры поверхности некоторых белков, в частности α -химотрипсина, показал, что регистрируемого количества связанной воды, даже по максимальной из приведенных оценок, недостаточно для заполнения одного монослоя [176]. При этом до 30 % поверхности α -химотрипсина оказывается незанятой водой.

Не обнаружили корреляции с величиной граничной с водой поверхности и данные модельных исследований. Измерения количества связанной воды по интенсивности узкой линии ЯМР от незамерзшей воды при $-20^\circ \div -30^\circ \text{C}$, где данная величина слабо зависит от температуры в дисперсных системах [316, 314], показывают, что ее количество в водных дисперсиях аэросила, На-монтмориллонита, Са-каолинита, гидрофобного фторопласта и раствора белка коррелирует с числом полярных групп на граничной с водой поверхности, а не с величиной этой поверхности [149]. Незамерзшая при низких температурах вода практически отсутствовала у чисто гидрофобной поверхности фторопласта, в его водной суспензии (рис. 3).

Следовательно, если принять приведенные выше оценки метода ЯМР-измерений при отрицательных температурах, а также методов, дающих сходные оценки для количества связанной воды с измененной структурой, то придется сделать вывод об отсутствии связанной воды вблизи гидрофобной поверхности. Подобный вывод явно не согласуется с хорошо известным фактом существования гидрофобных эффектов в подобных системах.

Не меньшее число вопросов вызывают и данные сравнительных исследований количества связанной воды в растворах нативных и денатурированных биополимеров. Гидрофобные взаимодействия, которые вызывают сворачивание макромолекулы белка в компактную глобулу, обусловлены стремлением уменьшить термодинамически невыгодные изменения в структуре воды по сравнению с развернутой конформацией белка [77, 152, 94, 95, 309, 351]. Поэтому следовало ожидать, что переход в клубкообразную рыхлую структуру белка в процессе денатурации будет приводить к значительному увеличению количества связанной воды. Однако данные ЯМР-измерений при отрицательных температурах показывают, что увеличение количества связанной воды после денатурации белков не превышает 10 % [316, 314]. Еще меньший прирост количества связанной воды — обычно около 3–5 % — был зарегистрирован мето-

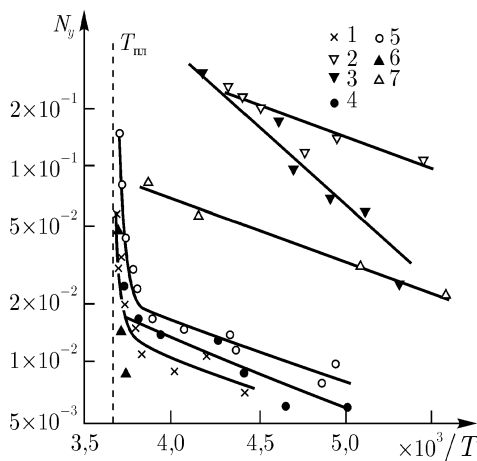


Рис. 3. Зависимость относительного содержания подвижной фазы воды от обратной температуры для раствора белка (1), адсорбционных пленок воды на аэросиле (2), адсорбционных пленок воды на силикагеле (3) и водных дисперсий: На-монтмориллонита (4), аэросила (5), фторопласта (6), Са-каолинита (7); $T_{пл}$ — температура плавления льда [149]

дом калориметрии [171, 170]. Имеются также сведения о наличии вообще противоположного явления — уменьшения количества связанной воды после денатурации белков, согласно данным гравиметрических [184] и калориметрических измерений [170], а также и ЯМР-измерений при отрицательных температурах [149].

Изменение состояния воды в растворах белков после их денатурации должно проявляться и в изменении соотношения между рыхлой льдоподобной и более плотной структурой в пределах водной компоненты. Однако изучение эффектов давления на изменение объема в водных растворах белков при денатурации показало, что они несопоставимо меньше таких же эффектов, наблюдаемых в модельных водных растворах низкомолекулярных соединений [351]. Наконец, практически отсутствует связь между температурой денатурации для белков и фактором их гидрофобности [351, 194, 299].

Но если принять, в соответствии с приведенными выше данными, что вода практически не меняет свою структуру даже после денатурации белков, то становится бессмысленным рассмотрение влияния воды на структуру белков, и тем более непосредственного воздействия воды на эффективность биологических реакций с участием белков.

Вместе с тем имеются данные о наличии эффектов энтальпийно-энтропийной компенсации в таких системах [156, 152, 324]. Термодинамические измерения показывают, что, например, при добавлении полиэтиленгликоля (ПЭГ) к водному раствору ДНК при его высоких концентрациях наблюдается частичная дегидратация ДНК, энергетический вклад которой количественно вдвое превышает вклад от всей связанной макромолекулами ДНК воды, определенной с помощью физических методов [185].

Сопоставление этих результатов позволяет предположить, что при интерпретации данных физических методов, по-видимому, используются недостаточно строгие допущения и что эти методы обнаруживают лишь часть состояний связанной воды.

1.3. Об интерпретации результатов физических методов в исследовании состояния воды в биологических системах

Рассмотрим в этой связи результаты ЯМР-измерений при отрицательных температурах, где количество связанной воды определяется по интенсивности узкой линии резонанса от протонов незамерзшей воды [314, 316]. Однако возможность регистрации отдельной узкой линии от незамерзшей воды определяется не только высокой подвижностью ее молекул, но и наличием для них отдельной фазы, где время жизни молекул превышает выраженную в шкале частот ширину резонанса (в данном случае около 10^3 с^{-1}). В соответствии с соотношением

$$\nu = \left(\frac{kT}{h} \right) e^{-E_{\text{акт}}/kT},$$

где ν — частота переходов из одного состояния в другое, k — постоянная Больцмана и h — постоянная Планка, имеем, что для этого необходима энергия связи, превышающая 11–12 ккал/моль (без учета возможного изменения энтропии) [8, 10, 254]. Такое условие выполняется вблизи заряженных групп биополимеров или там, где обмен затруднен стерическими факторами. Именно эта вода действительно регистрируется с помощью предложенного метода, что, как и отмечалось, находится в соответствии с данными модельных экспериментов [149]. Вся остальная, более слабо связанная вода должна обмениваться с объемной водой за указанный интервал времени, и она будет тогда влиять на характеристики широкой линии ЯМР от замерзшей воды [8, 10, 254]. Действительно, ширина данной линии лишь постепенно достигает своего максимального значения

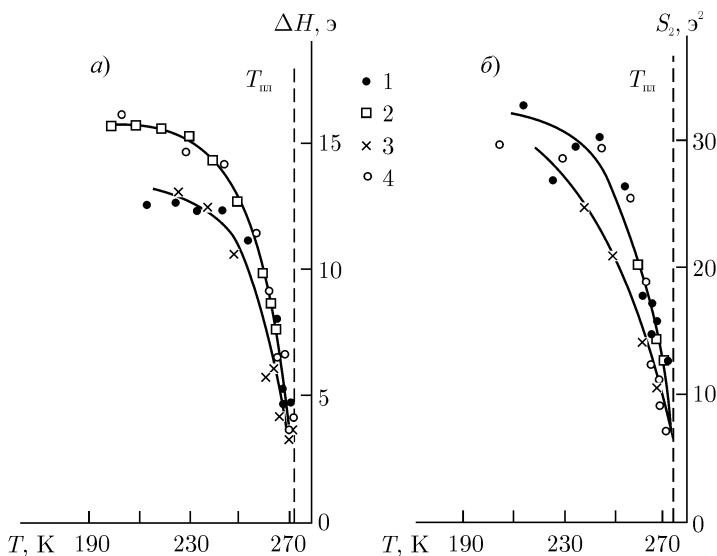


Рис. 4. Зависимость ширины широкого компонента ΔH (а) и второго момента всей линии S_2 (б) от температуры для поликристаллического льда (1), раствора белка (2) и водных дисперсий: На-монтмориллонита (3) и аэросила (4) [149], $T_{пл}$ — температура плавления (рис. 3)

в модельных системах при понижении температуры примерно до 210° K (рис. 4) [149].

Быстрые переходы из одного состояния в другое могут реально влиять и на данные измерений методом ИК-спектроскопии. Учитывая время жизни водородной связи в воде (около 1,5 пс [249]), а также наличие в воде процессов передачи протона со скоростями, превышающими скорость диффузии молекул воды [135], можно ожидать, что такие процессы приведут к дополнительному уширению и к перекрыванию соседних линий в интервале до нескольких десятков см^{-1} [254]. Данные такого рода по уширению линий воды в ИК-спектрах следует иметь в виду и при обсуждении результатов метода, на которых основана так называемая «континуальная» модель жидкой воды.

Рассмотрим теперь результаты метода калориметрии. Для определения количества связанной воды из-за отмеченной особенности фазового перехода в малых системах [304] используется регистрация момента появления пика теплоемкости вблизи 0° C, связанного с появлением сво-

бодной воды в системе в ходе добавления воды к высушенным биологическим образцам [170, 171]. При этом полагается, что вся последующая за появлением такого пика вода является свободной. Однако регистрация пика теплоемкости около 0°C означает лишь, что какая-то часть сорбированной воды становится способной образовывать 4 водородные связи с соседями. Кроме того, не учитывается последовательность заполнения различных участков поверхности макромолекул при увеличении количества сорбированной воды.

Согласно исследованиям на модельной системе — силикагеле, — выполненным с помощью метода ЯМР, адсорбция воды первоначально идет на активные центры, вокруг которых образуются островки молекул воды. При толщине, соответствующей БЭТ монослою, поверхность покрыта отдельными островками молекул воды толщиной в 2–3 молекулы. И лишь при наличии количества воды, превышающего 3 БЭТ монослоя, наблюдается практически полное покрытие всей поверхности силикагеля водой [127]. Поскольку расположение воды вблизи гидрофобной поверхности энергетически невыгодно, то она появляется там, по-видимому, уже после образования объемной фазы воды над гидрофильно связанной. И лишь в дальнейшем вода вытесняется на гидрофобные участки поверхности. Следует отметить в этой связи, что при увеличении количества объемной воды, например в образцах ДНК, изменение теплоемкости распространяется в сторону низких температур, вплоть до -30°C [171], что трудно объяснить наличием вклада только от объемной воды. Следовательно, и данные метода калориметрии учитывают лишь часть воды с измененной структурой.

Последовательность заполнения различных участков поверхности биополимеров водой необходимо учитывать и при изучении процессов адсорбции воды биополимерами с помощью метода гравиметрии. Кроме того, на кривые сорбции воды при относительно низкой влажности может влиять взаимодействие между противоположно заряженными группами на поверхности соседних макромолекул, связь между которыми нарушается лишь после появления воды, имеющей более высокую диэлектрическую постоянную по сравнению с прочносвязанной водой [23] (см. главу 2).

Таким образом, указанные выше методы способны зарегистрировать лишь относительно прочно связанную воду, для которой они дают довольно близкие оценки. Вопрос о возможности регистрации с их помощью других состояний связанной воды остается открытым.

Следующий метод — диэлектрическая спектроскопия — довольно широко используют для изучения состояния воды в биологических системах [126, 301]. Особый интерес здесь вызывает миллиметровый (КВЧ) диапазон длин волн, характерный для их поглощения свободной

водой, где, как можно было ожидать, не будет поглощать связанная вода. Но определяемое этим методом время переориентации молекул воды не обязательно связано со временем жизни ее молекул в различных состояниях. Так данные ЯМР указывают на отсутствие, как правило, эффектов изотопного замещения для воды в растворах биологических макромолекул [3, 52], что свидетельствует о быстром вращении молекул связанной воды вокруг продольной оси, не относящейся к переориентации в поле заряда. С определенностью можно утверждать, что процесс переориентации будет затруднен лишь в поле зарядов или же при наличии стерических ограничений. Во всех остальных случаях необходимы дополнительные исследования. Кроме того, следует учитывать, что результаты определения таким методом количества связанной воды зависят от принятого при расчетах поглощения КВЧ значения диэлектрической постоянной для возможных различных состояний связанной воды.

1.4. Состояние воды в биологических системах по данным метода ЯМР

Метод спинowego эха ЯМР позволяет изучить состояние воды в биологических системах на основе измерения нескольких характеристик: времени спин-решеточной релаксации T_1 и спин-спиновой релаксации T_2 для протонов или дейтронов воды, коэффициента самодиффузии D для молекул воды, а также частотной зависимости T_1 . Интерпретация данных этого метода, с помощью которого зарегистрированы единые значения T_1 и единые значения T_2 для всех протонов воды в растворах биополимеров, исходит из модели быстрого обмена между фракцией свободной и, как первоначально принималось, единой фракцией связанной воды. В таком случае из двух измеренных параметров — T_1 и T_2 — можно в принципе определить время корреляции для связанной воды и ее содержание [3, 323].

Однако представление об однородности фракции связанной воды противоречит другим результатам того же метода. Согласно теории, для случая $T_1 > T_2$ [5, 217], наблюдаемого в растворах биополимеров, T_1 должно уменьшаться при повышении температуры, тогда как в экспериментах регистрируют противоположную зависимость [3, 323, 51, 52]. Теория предсказывает также, что отношение T_1/T_2 должно изменяться пропорционально квадрату частоты резонанса, но данные измерений не согласуются с этим. В различных растворах биополимеров значения энергии активации, определяемые по температурной зависимости T_1 и T_2 для протонов воды, меняются в пределах от 0 до 6 ккал/моль, они зависят от концентрации биополимера, значения pH раствора

и т. д. [51, 52, 44]. Все эти данные показывают, что подобная интерпретация, равно как и полученные с ее помощью оценки количества связанной воды, является некорректной.

В последующих работах использовали модели, основанные на наличии помимо свободной воды еще двух состояний — слабо- и прочно-связанной воды, причем каждому из них приписывали свое, единое для фракции время корреляции [303, 128, 302]. На этой основе было получено якобы хорошее согласие между расчетными и экспериментальными значениями T_1 для протонов воды в растворах сывороточного альбумина различной концентрации при изменении частоты резонанса в пределах 4 порядков [302].

Однако с физической точки зрения трудно говорить о «хорошем согласии», если оно достигается в условиях, когда количество прочно-связанной воды на одну макромолекулу СА может изменяться при разных концентрациях белка от 4,5 до 242, а количество слабосвязанной воды в 5 раз. По-видимому, для получения реальных оценок количества связанной воды необходимо учитывать динамику связывающих воду макромолекул биополимеров. Но из-за отсутствия прямой связи между значениями T_1 и T_2 для протонов воды и подвижностью макромолекул отдельные авторы пытаются использовать косвенные показатели.

В одной из таких работ изучалась зависимость от частоты резонанса, при ее изменении в пределах почти 4 порядков, для T_1 от протонов и дейтронов воды в растворах белков различной молекулярной массы [303, 128]. Был зарегистрирован широкий спектр частот движения молекул связанной воды, анализ которого привел авторов к заключению о наличии определенной корреляции между положением точки максимального наклона для значений I/T_1 от протонов воды в зависимости от частоты резонанса и молекулярной массы белка (рис. 5). Но если исходить из значений времени корреляции для связанной воды, определенных на основе такого соотношения, то ее количество составит всего около 0,1% от массы белка. Кроме того, анализ показывает, что еще лучшая корреляция наблюдается между положением упомянутой выше точки и значением молекулярной массы белка в степени $2/3$, т. е. не с массой, а с поверхностью белков. К тому же это лишь одна область спектра. На самом деле связь между динамикой связанной воды и динамикой белка имеет сложный характер, на что указывает широкая дисперсия значений T_1 в зависимости от частоты резонанса (рис. 5), не объяснимая одним лишь движением макромолекул как целых. Следует отметить также присутствие высокочастотной составляющей для движения молекул связанной воды, которая не обнаруживает прямой зависимости от подвижности связывающих воду макромолекул [303, 128].

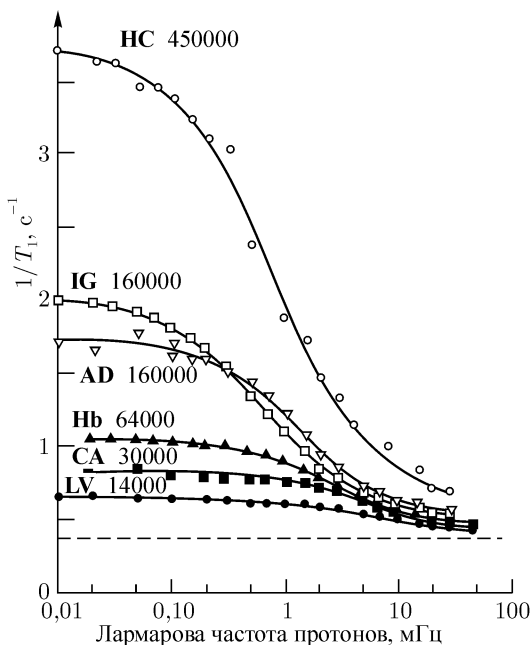


Рис. 5. Частотная зависимость $1/T_1$ для протонов воды при 25°C для 5%-ых растворов белков с различной молекулярной массой: HC — гемоцианин (молекулярная масса указана на рисунке), IG — иммуноглобулин, AD — алкогольдегидрогеназа из дрожжей, Hb — гемоглобин, CA — карбоангидраза, LV — лизоцим. Скорость релаксации $1/T_1$ для протонов чистой воды показана прерывистой линией [128]

Приведенные результаты показывают, что для получения реальных оценок состояния воды методом ЯМР необходимо учитывать целый ряд факторов. Прежде всего, прямая зависимость динамики связанной воды от динамики биополимера должна наблюдаться тогда, когда время жизни молекул воды в связанном состоянии заметно больше времени, определяемого движением макромолекулы в воде. Это справедливо для прочносвязанной воды, время жизни для которой находится в пределах от 10^{-3} до 10^{-7} с [133]. Далее, поскольку вода связывается в первую очередь на граничащей с ней поверхности биополимеров, то именно движение боковых групп, более высокочастотное по сравнению с движением самих макромолекул, должно определять динамические характеристики

такой воды. Подобная связь действительно обнаруживается при сравнении данных для протонов воды с полученными ранее результатами для протонов боковых групп белка СА в тех же растворах [51, 52]. Уже это позволило более чем на порядок повысить оценки количества связанной воды по сравнению с указанными выше данными. Вместе с тем сравнение данных по T_2 для протонов воды и белка свидетельствует о наличии еще одного состояния прочносвязанной воды, воздействие которого на величину T_2 для протонов воды, по-видимому, определяется временем ее обмена с окружающей водой и относительно слабо зависит от подвижности самого белка. Это может быть связано с нахождением такой воды в подповерхностных слоях белка или с затрудненностью обмена связанной воды с объемной из-за межбелковых или белково-лигандных взаимодействий [33]. Последнее, в частности, обуславливает повышение T_1 для протонов воды в сыворотке крови онкологических больных по сравнению со здоровыми людьми вследствие сорбции продуктов распада, в основном полипептидной природы, на поверхности белка СА [23].

На время релаксации для протонов воды в растворах биополимеров в определенной степени влияет обмен протонами между водой и гидроксильными и иминокислыми группами биополимеров, имеющими довольно высокие скорости обмена [8]. О таком влиянии свидетельствует, например, регистрация заметного превышения амплитуды сигнала ЯМР от подвижных протонов над величиной, ожидаемой только от протонов воды в растворах крахмала высокой концентрации [53]. Подобный вывод был сделан также на основе измерений отношения T_1/T_2 , которое для протонов и дейтронов воды в биологических системах оказалось в несколько раз выше по сравнению с данными ЯМР для кислорода воды ^{17}O [289].

Однако все указанные эффекты, относящиеся к прочносвязанной и, следовательно, сравнительно малоподвижной воде или к обмениваемым протонам белка, не позволяют объяснить наблюдаемую температурную зависимость T_1 для протонов воды в растворах биополимеров. Исследования температурной зависимости T_1 для воды в растворах СА, вируса табачной мозаики (ВТМ) и различных биополимеров, которые значительно отличаются по своим динамическим характеристикам, указывают на наличие двух типов зависимостей, относящихся к растворам макромолекул с высокой и низкой подвижностью [303, 128]. Энергия активации для первых находится в пределах от 3 до 5 ккал/моль, а для последних близка к нулю. Анализ этих данных приводит к выводу о наличии в растворах биополимеров по крайней мере двух состояний слабосвязанной воды. Наблюдаемые два типа температурных зависимостей показывают, что в растворах, содержащих подвижные макромолекулы, частоты движения для воды в обоих состояниях превышают частоту ре-

зонанса, тогда как вблизи малоподвижных макромолекул частоты движения молекул воды для одного из этих состояний выше, а для другого ниже частоты резонанса. В последнем случае температурные зависимости для T_1 от протонов воды для таких состояний имеют противоположные знаки, а их сумма становится близкой к нулю [254].

Полученные выводы находятся в хорошем согласии с результатами исследования частотной зависимости T_1 для протонов воды в растворах белков различной молекулярной массы [303, 128]. На основе этих экспериментов был выделен высокочастотный компонент движения молекул воды, не связанный с частотами движения макромолекул (рис. 5). Кроме того, в растворах белков с молекулярной массой около 1 миллиона Да наблюдается еще один высокочастотный компонент движения молекул связанной воды, который относится к хвосту спектра частот, определяемого взаимодействием воды с такими макромолекулами. Подвижность этой фракции слабосвязанной воды лишь отчасти зависит от подвижности макромолекул белков. Данные два компонента имеют противоположные знаки температурной зависимости для T_1 , что находится в полном соответствии с упомянутыми выше выводами, сделанными на основе анализа результатов для другого объекта — раствора ВТМ [51], имеющего еще большую молекулярную массу.

1.5. Заключение

Следовательно, помимо нескольких состояний прочносвязанной воды, подвижность которых зависит от подвижности макромолекул в воде, существуют еще по меньшей мере два состояния слабосвязанной воды. В одном из них вода частично увлекается движением макромолекул, а в другом слабо зависит от их подвижности. Обмен со слабосвязанной водой вносит наибольший вклад в T_1 для протонов воды в случае малоподвижных макромолекул. Наличие в последнем случае заметного вклада именно от воды, слабо взаимодействующей с биополимерами, но имеющей существенно более низкие частоты движения по сравнению со свободной водой, подтверждается изменением величины T_1 для протонов воды при частичном замещении обычной воды на тяжелую [281, 51].

Полученные выводы имеют важное биологическое значение, так как именно состояние слабосвязанной воды может заметно меняться в процессе формирования нативной структуры белковых глобул в воде или при изменении конформации белков в ходе биологических реакций. Этим оно отличается от наблюдавшихся небольших изменений количества прочносвязанной воды. Существенно при этом, что энергетический вклад от слабосвязанной воды, если исходить из данных прямого калориметрического измерения эффектов частичной дегидратации ДНК при добавле-

нии полиэтиленгликоля [185] сопоставим с суммарным вкладом от прочно связанной воды.

Таким образом, реальная картина состояния воды в биологических системах заметно более сложна, чем это принималось ранее на основе данных различных физических методов [254]. Она полностью соответствует представлениям о непосредственном участии воды в формировании нативной структуры биологических макромолекул, а также о возможности воздействия изменений ее структуры на ход и эффективность биологических реакций. Но это еще не позволяет говорить о стабилизирующей роли воды в биологических структурах, так как существует и другая сторона ее воздействия на такие структуры, которая обуславливает, наоборот, тенденцию к разрыхлению структуры макромолекул за счет эффектов конкуренции воды за водородные связи в их пределах. Эта сторона воздействия воды будет рассмотрена при обсуждении особенностей структуры биополимеров, в первую очередь глобулярных белков, участие которых практически во всех биологических реакциях как раз и определяется возможностью двойственного воздействия воды на их структуру.

ГЛАВА 2

Особенности пространственной структуры глобулярных белков и влияние на нее воды

2.1. Проблема связи между структурой и функцией белков

Решение проблем функционирования любых биологических систем зависит, в конечном счете, от выяснения роли и механизмов действия глобулярных белков, с помощью которых и с обязательным участием воды происходят практически все биологические процессы. Именно белки обеспечивают эффективность функционирования различных биологических структур и возможность регулирования проходящих в организмах реакций, причем во всех таких процессах значительную роль выполняет вода. Белки должны обеспечить и энергетическую выгоду основной массы проводимых с их участием реакций, что, например, не обязательно для ДНК, чья доля в общей энергетике клетки невелика. В свою очередь, многообразие функций белков в общем соответствует, хотя и весьма косвенно, сложности и разнообразию строения белковых макромолекул, которые лишь отчасти удается описать на основе некоторого минимального числа структурных единиц. Еще более сложным оказалось нахождение связи между особенностями структуры и функциональными характеристиками глобулярных белков [94, 95]. Отмеченные трудности имеют принципиальный характер и не связаны, например, с недостатком сведений по структуре белков — к настоящему времени известны пространственные структуры для нескольких сотен глобулярных белков, а для нескольких тысяч белков выяснены их аминокислотные последовательности [273]. На основе полученных данных глобулярные белки, в зависимости от соотношения тех или иных относительно стойких структурных элементов, разделены на α -спиральные, β -структурные, $\alpha + \beta$ и α/β белки. В макромолекулах белков выделяют также ряд повторяющихся в разных белках более сложных структурных

единиц [247]. Но основная часть объема глобулярных белков в большинстве случаев принадлежит к нерегулярным участкам. К тому же следует учитывать, что отнесение определенных участков структуры белковых макромолекул к α -спирали или к β -структуре часто имеет лишь приближенный характер, причем уменьшение величины допустимых отклонений от α -спирали, например вдвое, может почти в такое же число раз уменьшить долю подобных структур в пределах глобулы.

Вместе с тем поиски связи между принадлежностью белков к α -спиральному или β -структурным, или $\alpha+\beta$, или α/β белкам и выполняемой или функцией не дали определенного результата [247]. Более того, анализ распределения длин α -спиральных участков для белков с известной пространственной структурой показал, что оно близко к распределению, ожидаемому для произвольной последовательности аминокислот [197].

Не привело к заметным успехам и использование теории самоорганизации белковых глобул из полимерной цепи с линейной памятью, находящейся во внешнем поле [155]. Многие предсказания данной теории не получили экспериментального подтверждения, что может быть объяснено за счет относительно небольшого вклада, по сравнению с вкладом от различных видов взаимодействия в белках, от энтропии системы, связанного с изменением числа взаимных положений участков полипептидной цепи, в свободную энергию системы. Исходя из определения энтропии S для цепи из N звеньев, где каждое звено может принимать n положений, имеем для общего числа конформаций W :

$$S = k \ln W = k \ln n^N = kN \ln n.$$

Учитывая, что $n \sim 10$, а $\ln n \sim 2$, для одного звена вклад от предельного суммарного изменения энтропии $\Delta S \sim 2k$, где k — постоянная Больцмана. Тогда общий вклад таких изменений в свободную энергию системы в расчете на одно звено составит $\Delta ST = 2kT$, т.е. порядка 1 ккал/моль. И это характерно для суммарного изменения энтропии между предельными случаями полностью свернутой и полностью развернутой конформаций полипептидной цепи. Подобный вклад существенно меньше вклада в свободную энергию от других видов взаимодействия в пределах белковых макромолекул. Поэтому один лишь энтропийный фактор не может, как предполагалось, ограничить возможный размер белковых глобул [94], не говоря уже о том, что это противоречит наличию реально существующих различных нековалентно связанных надмолекулярных образований. Не является он определяющим и для пространственной организации белковых глобул, что важно в связи с обсуждением эффектов гидрофобных взаимодействий. Нельзя не учитывать также, что данная теория совершенно не касается индивидуальных различий между разными

ми видами глобулярных белков и, тем более, возможных связей между их структурными и функциональными характеристиками.

Указанные замечания, однако, не отрицают возможности заметного вклада от изменений энтропии, связанного с изменением укладки полипептидной цепи в общий баланс сил в пределах белковых глобул, который определяется суммарным вкладом от различных видов взаимодействий и играет существенную роль в биологических процессах.

Проблему взаимосвязи между структурой и функцией глобулярных белков не удалось решить и с помощью методов расчета пространственной структуры на основе их аминокислотной последовательности, несмотря на отдельные успехи в расчетах положения α -спиральных, β -структурных и других участков в пределах полипептидной цепи [247, 199]. Предполагается, что совершенствование методов расчета позволит заметно улучшить согласие между теоретическими и экспериментальными данными [247].

Однако расчет структуры белковой глобулы, учитывающий лишь последовательность расположения ближайших соседей по полипептидной цепи, по-видимому, не может дать решения проблемы пространственной структуры белковых макромолекул в принципе. Участки глобулы, воспроизводящие свою структуру от белка к белку, независимо от расположения других участков полипептидной цепи, являются, следовательно, нечувствительными к изменениям конформации белковой макромолекулы, которые сопровождают ее участие в биологических реакциях в качестве обязательного условия [290]. Поэтому участки макромолекулы с относительно постоянной структурой, свидетельствующей о наличии достаточно прочных связей в их пределах, могут составлять лишь часть объема белковой глобулы. Они, по-видимому, и не должны иметь связи с биологической функцией определенных белков, что полностью соответствует приведенным выше данным. Что же касается другой части белковой глобулы, то именно ее вариабельность в различных белках заставляет предположить, что такие участки должны быть непосредственно ответственными за изменение конформации белка в ходе биологических реакций и от них будет существенным образом зависеть функциональная активность белка и эффективность проводимых с его участием процессов.

2.2. Особенности структуры белков и их устойчивости

Перечисленные выше данные показывают, что проблему особенностей структуры глобулярных белков следует рассматривать не саму по себе, а конкретно, исходя из тех требований к структуре, которые необ-

ходимо удовлетворить для выполнения белками свойственных им биологических функций. И прежде всего следует рассмотреть вопрос об устойчивости глобулярных белков, от которой зависит сама возможность их существования.

Устойчивость различных структур обычно связывают с их стабильностью или прочностью, и в этом смысле традиционным является выделение в пределах белковых глобул наиболее стабильных участков. Но биологические структуры не относятся к химически стабильным или достаточно прочным. Более того, имеются принципиальные ограничения для существенного повышения их стабильности не только из-за общей нестойкости сложных органических соединений, составляющих такие структуры, но и потому, что нестабильными являются даже многие аминокислоты [114, 11, 17]. Хотя средняя энергия теплового возбуждения kT при обычных температурах среды составляет лишь около 0,6 ккал/моль, тепловые флуктуации в течение 10 с позволяют преодолеть потенциальный барьер около 20 ккал/моль, а в течение года — уже до 30 ккал/моль. В результате при обычных температурах среды ряд аминокислот превращается из оптически активных в рацемическую смесь за время порядка 10^5 лет, а 5 из 20 аминокислот — аргинин, гистидин, серин, треонин и цистеин — заметно разлагаются за тот же интервал времени и полностью исчезают из геологических отложений за 10^7 лет [114]. Учитывая, что нарушение функциональной активности может наблюдаться уже при изменении одной аминокислоты и лишь для части белков, данный интервал времени из-за нарушений даже на уровне мономеров может быть сокращен при обычных температурах на 2–3 порядка.

Следовательно, само существование практически всех биологически важных соединений и структур уже не может определяться их химической стойкостью и стабильностью, а полностью зависит от воспроизводства данных систем в процессах биосинтеза. Требования же к воспроизводству, где ключевую роль играют наличие строгого соответствия между всеми участниками процесса по их химическим, стерическим и другим характеристикам, а также возможность управления (регулирования) в ходе данного процесса не только не совпадают, но даже противоречат требованиям к стабильности или прочности участвующих в таком процессе структур [13, 17, 256].

Соответствие между всеми участниками процесса воспроизводства означает, что на каждом его этапе и в каждый интервал времени включаются только определенные соединения или структуры из всей их массы, содержащейся в пределах организма и в окружающей его среде. Для этого необходимо, чтобы биологические структуры и, в первую очередь, участвующие во всех реакциях белки были способны не только выбирать соответствующие соединения. Они должны быть также чувстви-

тельными к относительно небольшому различию между «своим» субстратом и близким и нему по структуре соединением, которое (или само по себе или продукты его преобразований в ходе биологической реакции) могут оказаться токсичным для организма. Следовательно, биологические соединения или структуры должны обладать высокой избирательностью.

Другим неперенным условием является необходимость управления (регуляции) в ходе процесса воспроизводства с целью сохранения соответствия между количеством производимых продуктов и их участием в последующих стадиях данного процесса, а также между местом и временем производства различных компонентов биологических реакций.

Избирательность основана, прежде всего, на наличии строгого стерического соответствия между активными центрами белков и контактирующих с ними участков поверхности взаимодействующих соединений, которое, как известно, может достигаться в ходе самой биологической реакции [308, 290]. Но подобная избирательность, из-за отсутствия сил дальнего действия, ограничивается взаимодействием с непосредственно контактирующими с белком определенными молекулярными группами в составе различных соединений или структур. Довольно ограниченной оказывается и возможность регулирования проходящих реакций. В результате фактор прямого стерического соответствия сам по себе находит относительно ограниченное применение, прежде всего, в процессах узнавания, а также в иммунологических реакциях, для прохождения которых обычно достаточно присутствия определенных групп или структур, независимо от состава других молекулярных групп или структур во взаимодействующих системах [183].

Заметно более жесткие требования к избирательности и регулированию предъявляются в случае ферментативных реакций, скорость которых по ряду данных зависит не только от стерического соответствия между активным центром фермента и определенными группами субстрата. Она может быть изменена на несколько порядков величины в зависимости от наличия в составе субстрата тех или иных групп, которые прямо не взаимодействуют с поверхностными участками белка [132, 227]. Поскольку прямое влияние дальнего действия сил исключено, то подобные факты обычно объясняют наличием вклада от растворителя, в данном случае воды, в свободную энергию ферментативной реакции [156, 152]. Именно с такими явлениями связывают возможность непосредственного влияния воды и изменений ее состояния на биологические реакции.

Появление такого рода эффектов от воды определяется ее взаимодействием с внешними, не контактирующими между собой группа-

ми белка и субстрата, что должно приводить к изменению вклада от гидрофобного взаимодействия. Но это лишь одна сторона воздействия; необходимо также создать условия, при которых малые различия в энергии взаимодействия могли бы заметно отразиться на скорости процесса ферментативного катализа. Такая возможность появляется в том случае, когда различные виды взаимодействий в пределах макромолекул глобулярных белков примерно уравновешены между собой, или, более строго, когда переходы между разными состояниями белковой макромолекулы в ходе биологических реакций связаны с малым изменением свободной энергии. Тогда небольшое изменение энергии взаимодействия будет приводить к заметному сдвигу равновесия и скорости реакции в нужном направлении. Те же условия являются оптимальными и для реализации оптимального управления биологическими процессами, поскольку в этом случае оно становится возможным при использовании относительно слабых воздействий [253, 255].

Рассмотрение на данной основе сведений по структуре глобулярных белков показывает, что многие особенности их структуры и воздействия на нее воды, по-видимому, определяются необходимостью удовлетворения указанных требований к равновесию сил. При этом решающее значение в обеспечении подобного равновесия сил в пределах белковых макромолекул имеет их взаимодействие с водным окружением.

2.3. О двойственном характере воздействия воды на структуру белков

Возможность влияния воды на равновесие сил в пределах макромолекул биополимеров обусловлена ее двойственным воздействием на их структуру — помимо гидрофобного взаимодействия, стабилизирующего структуру глобулярных белков, вода оказывает и другой, разрушающий их структуру тип воздействия за счет конкуренции молекул воды за водородные связи между СО- и NH-группами полипептидной цепи. Измерения на водных растворах низкомолекулярных соединений [312, 297] и данные теоретических расчетов [198] показали, что разность энтальпий образования прямых водородных связей между данными группами белка или через посредство молекул воды близка к нулю. Это позволяет молекулам воды конкурировать за водородные связи между пептидными группами белка, эффект которых проявляется, в частности, в том, что значительно увеличивается степень спирализации глобулярных белков при их переносе из воды в органические растворители, образующие более слабые водородные связи с пептидными группами белка [196].

Наличие подобного эффекта конкуренции позволяет молекулам воды непосредственно внедряться в водородные связи между пептидными группами белка, разрыхляя его структуру, что подтверждается нашими исследованиями на модельном объекте — линейном полиэтиленимине (ЛПЭИ) [44, 265]. Использование метода спинного эха ЯМР для изучения эффектов гидратации ЛПЭИ, имеющего 2 % разветвлений, показало, что увеличение количества молекул воды в системе весьма нелинейно влияет на подвижность протонов полимера и воды. Особый интерес вызывает уменьшение их подвижности с ростом содержания воды на начальных этапах гидратации, вплоть до некоторого предела (рис. 6а), что регистрируется по ускорению спада спинного эха от протонов воды и полимера. Ускорение спада достигает максимального значения вблизи 37 % содержания воды, примерно соответствующего 1 М молекул воды на 1 М NH-групп полимера, тогда как при последующем увеличении количества воды начинается замедление спада спинного эха (рис. 6б), указывающее уже на повышение подвижности протонов полимера и воды.

Подобный характер зависимости подвижности протонов в системе ЛПЭИ–вода свидетельствует не просто о связывании воды NH-группами полимера, а об ее включении в водородные связи между цепями полимера и об изменении конформации полимера. В безводном ЛПЭИ большая часть аминогрупп участвует в образовании прямых внутри- и мецепочечных водородных связей. Добавление небольших количеств воды, по-видимому, не оказывает существенного воздействия на структуру полимера, поскольку для включения каждой отдельной молекулы воды между цепями полимера, связанными прямыми связями, необходимо их смещение друг относительно друга с возможным разрывом нескольких соседних прямых связей. Поэтому вода на первых этапах гидратации еще слабо воздействует на структуру полимера, в основном заполняя свободные объемы вблизи неплотно уложенных участков. И лишь при дальнейшем росте содержания воды она может сместить цепи полимера и включиться в водородные связи между ними [44, 265]. Вместе с тем следует отметить, что вода включается в структуру полимера лишь при наличии дефектов в его пространственной структуре, как в случае ЛПЭИ с 2 % разветвлений, тогда как в чисто линейном ЛПЭИ подобные эффекты отсутствуют [154].

Другим примером, показывающим значительную роль эффектов конкуренции воды за водородные связи, является тот факт, что модуль упругости волокна нейлона, который образует такие связи между волокнами полимера, при увлажнении уменьшается примерно в 5 раз [221].

Двойственная роль воды, как стабилизирующая, так и разрыхляющая структуру водородносвязанных полимеров и белков, проявляется

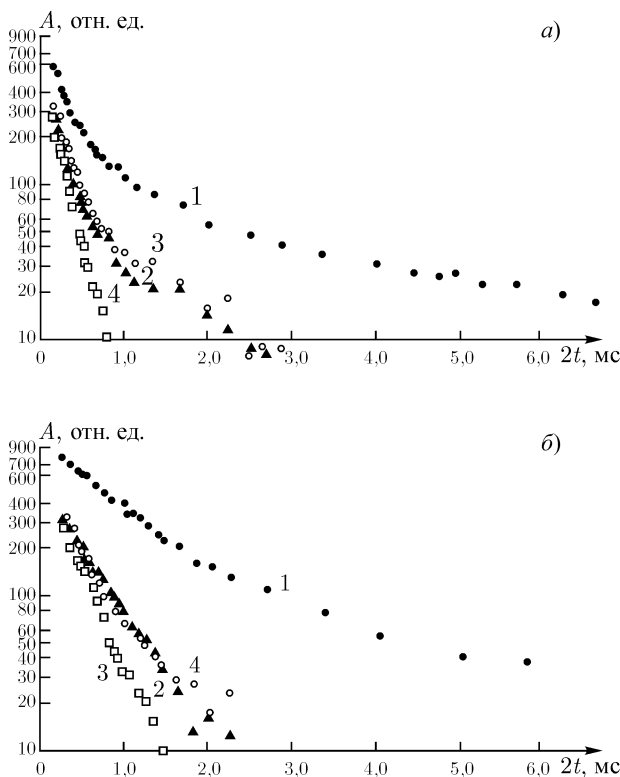


Рис. 6. Кривые спада спинового эха от протонов полимера и воды для ЛПЭИ при различной влажности полимера: а) 1 — 7 % H₂O, 2 — 13 % H₂O, 3 — 17 % H₂O, 4 — 37 % H₂O (на сухую массу полимера); б) 1 — 70 %, 2 — 42 %, 3 — 37 %, 4 — 26 % H₂O [44]

также и в макромолекулах ДНК. При малом содержании воды связи между макромолекулами ДНК, образующими двойную спираль, обладают максимальной прочностью, и для плавления такой спирали необходим нагрев образца при 55° С в течение довольно длительного времени. Повышение значений относительной влажности P/P_0 до 0,3 и более приводит к резкому возрастанию скорости процесса, очевидно, за счет того, что при увеличении содержания воды начинают проявляться эффекты конкуренции за водородные связи, максимальное дестабилизирующее

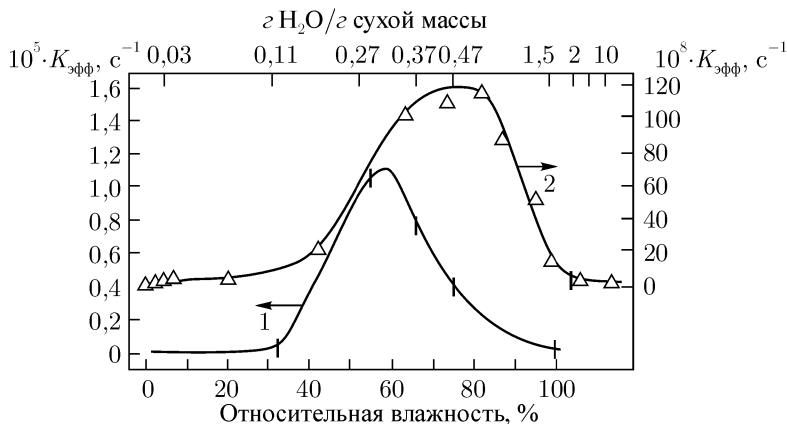


Рис. 7. Зависимость константы скорости $K_{\text{эфф}}$ необратимого изменения вторичной структуры ДНК (кривая 1) и константы гибели при 20° лиофилизированной биомассы микроорганизмов *Serratia marcescens* (кривая 2) от относительной влажности и содержания связанной воды [179]

воздействие которых на двойную спираль достигается при $P/P_0 = 0,6$ (рис. 7) [179].

Но уже дальнейшее увеличение относительной влажности дает обратный эффект — все большее уменьшение скорости плавления двойной спирали (рис. 7), по-видимому, вследствие того, что здесь появляются молекулы воды извне макромолекул, способные участвовать в стабилизации таких структур. Именно в данной области значений относительной влажности, как следует из данных рис. 8 [23], начинает появляться вода с более высокой диэлектрической постоянной ϵ по сравнению с прочносвязанной водой. Это должно быть отнесено к образованию кластеров из молекул воды, связанных между собой водородными связями. При малой влажности из-за низкой величины ϵ для связанной воды противоположно заряженные группы белка СА и низкомолекулярных лигандов непосредственно взаимодействуют между собой и компенсируют заряды друг друга, что приводит к уменьшению общего количества связанной воды по сравнению с чистым белком. И лишь увеличение ϵ для воды с ростом влажности разрывает связь между зарядами, и они становятся доступными для воды как у белка, так и у лигандов (рис. 8) [23]. В свою очередь, появление молекул воды, связанных между собой водородными связями, по-видимому, обуславливает и возник-

новение гидрофобных эффектов, влияющих на стабилизацию структуры макромолекул.

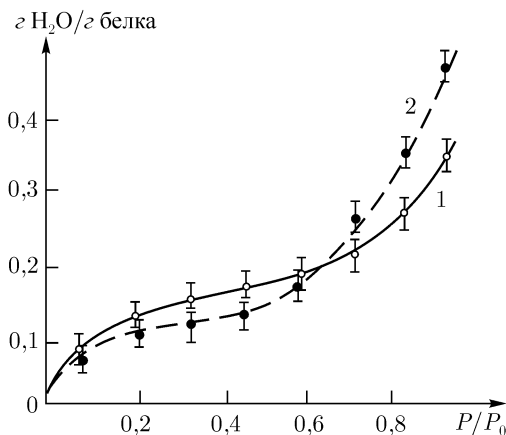


Рис. 8. Кривые сорбции воды белком СА (1) и СА с добавлением 1 М низкомолекулярных лигандов (НЛ) на 1 М белка (2) [23]

Следовательно, в случае ДНК удалось непосредственно продемонстрировать двойственную роль воды в ее воздействии на структуру биологических макромолекул. Подобные же эффекты наблюдаются и на клеточном уровне, где скорость гибели микроорганизмов, хранившихся при различной относительной влажности, также имеет максимум примерно при тех же промежуточных значениях влажности (рис. 7) [179].

2.4. Влияние воды на равновесие сил в пределах белковых макромолекул

Двойственный характер воздействия воды на структуру макромолекул биополимеров создает лишь предпосылки для равновесия сил в пределах макромолекул глобулярных белков, которое существенно зависит от деталей структуры последних, в первую очередь от особенностей распределения полярных и неполярных аминокислотных остатков на поверхности и внутри глобулы. Представления о ведущей роли гидрофобных взаимодействий в стабилизации нативной конформации глобулярных белков основаны на том, что взаимодействие различных групп белка

с водой должно приводить к вытеснению гидрофобных аминокислотных остатков внутрь белковой глобулы и к преобладанию на ее поверхности полярных остатков. Согласно Фишеру (цит. по [150]), для сферической глобулы с общим числом остатков более 120 и долей полярных аминокислот, равной 20 %, вся поверхность глобулы должна быть заполнена полярными аминокислотными остатками.

Однако такие расчеты не учитывают статистический характер распределения гидрофильных, гидрофобных и нейтральных групп в пределах макромолекулы, который должен определяться свободной энергией их переноса на поверхность или во внутреннюю часть глобулы. В расчетах, выполненных по методике, предложенной [77], исходят из того, что 40 % остатков являются гидрофобными, 20 % — гидрофильными и 40 % — нейтральными. Тогда в белках, содержащих более 100 аминокислот, на поверхности глобулы может располагаться около четверти гидрофобных остатков, а в белках, состоящих из более чем 200 аминокислот, доля таких остатков составит около 10 % или менее [150].

Вместе с тем эксперименты показывают, что у многих глобулярных белков число неполярных, гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности превышает их число внутри белка. Так распределение неполярных аминокислотных остатков между поверхностными и внутренними областями белковых глобул составляет, соответственно, в папаине 57 и 38, в рибонуклеазе 27 и 16, в субтилиазине 49 и 59, а в лизоциме 32 и 16, причем из поверхностных неполярных остатков лизоцима 8 находятся целиком в водной среде [312]. Неполярные остатки, как правило, занимают около половины или даже большую часть поверхности глобулярных белков [327]. Правда, наличие гидрофобных участков на поверхности макромолекул отчасти связано с их важной ролью в составе активных центров ферментов при взаимодействии с ними субстратов реакций или при взаимодействии между субъединицами в субъединичных белках. Но если исходить из ведущей роли гидрофобных взаимодействий в стабилизации нативной структуры белковой глобулы, то и участие гидрофобных групп в функционировании активного центра не может объяснить их преобладание на поверхности мономерных белков в условиях, когда все они могли быть размещены внутри макромолекулы.

Подобный характер распределения неполярных остатков в пределах глобулы далеко не случаен, о чем свидетельствует, в частности, такой факт, что при переходе от мезофильного штамма микроорганизмов к термофильному одна из неполярных групп на поверхности белка заменяется на гидрофильный аминокислотный остаток [235].

Нельзя не учитывать, кроме того, что и представления о наличии «гидрофобного ядра» внутри белковой глобулы [309, 94] также не получили экспериментального подтверждения, хотя внутри макромоле-

кул и обнаруживают несколько гидрофобных участков. Вместе с тем внутри белка присутствует и определенное количество молекул воды, вплоть до нескольких десятков, причем в ряде случаев их местоположение было установлено с помощью метода рентгено-структурного анализа [310, 278].

К этому следует добавить, что практически отсутствует связь между температурой денатурации белков и фактором их гидрофобности [351, 299], определенным по Тенфорду. Имеются также данные, что величина изменения свободной энергии при переносе гидрофобных аминокислотных остатков во внутреннюю часть глобулы недостаточна для объяснения стабильности ряда глобулярных белков [351, 299, 194].

Вместе с тем необходимо отметить, что уже исходя из самого факта существования не связанных ковалентными связями различных надмолекулярных структур, взаимодействия внутри которых увеличиваются пропорционально объему, тогда как гидрофобные взаимодействия лишь пропорционально поверхности, следует вывод, что гидрофобные взаимодействия в принципе не могут быть основным стабилизатором макромолекулярных систем.

В целом рассмотренные выше данные указывают на необходимость существенного пересмотра представлений о роли гидрофобных взаимодействий в глобулярных белках. При этом речь идет не об отрицании роли гидрофобных взаимодействий вообще. Как отмечалось в предыдущей главе, несмотря на отсутствие прямых экспериментальных данных об изменении состояния воды вблизи неполярных участков белковых макромолекул, реальность их участия в биологических процессах следует из данных термодинамических измерений и наличия эффектов энтропийно-энтальпийной компенсации в белково-водных системах [156, 152, 324]. Не противоречат этому и обсуждавшиеся выше данные. Они лишь свидетельствуют о том, что влияние гидрофобных взаимодействий на нативную конформацию глобулярных белков не сводится к ее стабилизации и что общая картина взаимодействий в пределах белковых макромолекул значительно более сложна, чем это ожидалось ранее.

2.5. Вода внутри белковых макромолекул

Остановимся теперь на другом аспекте воздействия воды на структуру биополимеров — ее разрыхляющем эффекте, связанном с конкуренцией молекул воды за водородные связи в пределах макромолекул. Хотя внутри белковых глобул зарегистрировано некоторое количество молекул воды, она может выполнять там различную роль, выступая либо лишь как неотъемлемый элемент их пространственной структуры, заполняющий какие-то свободные объемы в ее пределах, либо как активно

воздействующий на изменение конформации белка в ходе биологических реакций.

Некоторое число молекул воды, несомненно, входит в структуру макромолекул белков, и обычно применяемые методы сушки не приводят к ее удалению. Так после 48 ч сушки в вакууме (10^{-5} мм рт. ст.) белки сохраняют около 1% воды по отношению к их массе. Ее наличие было установлено, например, по появлению узкой линии протонного резонанса от подвижных молекул при нагреве белка до 100°C [280]. Более полное извлечение воды приводит к полной деструкции макромолекулы белка [285]. Имеются также данные, что удаление воды из белков при действии на них глубокого вакуума (10^{-8} – 10^{-10} мм рт. ст.) вызывало частичную инактивацию некоторых кристаллических ферментов [124].

Но та же структурная вода, по крайней мере, частично, по-видимому, активно участвует в функционировании белков. Она обладает некоторой подвижностью, что удалось зарегистрировать при повышенной температуре [280]. Хотя извлечь такую относительно подвижную воду из сухого белка весьма трудно, что свидетельствует об отсутствии «каналов» для ее выхода наружу, в водном окружении она способна к обмену. На это указывает довольно быстрый обмен меченой по тритию воды в белке химотрипсиногене с окружающей его водой [359]. Подобные результаты могут быть объяснены за счет создания с участием внешней и внутренней воды в пределах макромолекул свободных объемов, необходимых для перемещения воды, когда движение боковых групп белка, происходящее в водном окружении, освобождает пространство для движения и нижележащих слоев. Это обуславливает и возможность изменения конформации белка при участии воды, тогда как в ее отсутствие данный процесс затруднен. Последнее может объяснить давно известные факты устойчивости сухих белков в неводных растворителях, в том числе в абсолютном спирте, и их неустойчивости в спирте с примесью воды [245].

Вместе с тем ряд данных указывает на возможность прохождения некоторых реакций, катализируемых ферментами, в неводной среде [237, 313]. Но тщательные исследования показали, что такие реакции, равно как и каталитические реакции в твердой фазе [208] зависят от обязательного присутствия некоторого минимального количества воды [237]. Кроме того, в неводной среде исчезает избирательность реакций, характерная для ферментативного катализа, а каталитическая активность наблюдается и у такого белка, как сывороточный альбумин [313].

Следовательно, наличие некоторого минимального количества воды в пределах макромолекул белков является необходимым условием для выполнения ими своих биологических функций. И дело здесь не связано

с обязательным изменением общей конформации белков в присутствии воды, тем более, что имеется большое число данных, указывающих на близость структуры белков в водном растворе и в кристаллическом состоянии [201]. Но это относится к статической структуре белка, тогда как его функционирование связано с изменением конформации белка в ходе реакции и необходимостью обеспечения избирательности биологических реакций и возможности управления ими. Подобные требования к структуре белков выполняются именно в водной среде.

Таким образом, наличие двойственного воздействия воды на структуру глобулярных белков, наряду со сложным характером распределения полярных и неполярных аминокислотных остатков в пределах белковых макромолекул и наличием некоторого минимального количества воды внутри глобул, непосредственно связано с необходимостью выполнения ими своих биологических функций. Действие всех этих факторов приводит к тому, что изменение свободной энергии при денатурации белков, по результатам калориметрических измерений, составляет лишь 8–15 ккал/моль [193] при общей энергии гидратации на макромолекулу белка порядка 10^3 – 10^4 ккал/моль. Последний результат, как и другие приведенные здесь данные, находится в полном соответствии с представлением, что вода определяет равновесие сил в пределах белковых глобул. Именно это делает макромолекулу белка чувствительной к слабым воздействиям, необходимым для управления биологическими реакциями и их избирательности. В результате в таких реакциях участвует не только активный центр белка, но и вся глобула в целом, включая и возможность воздействия на реакции через различные области глобулы (например, аллостерическая регуляция) [95]. Равновесие сил приводит также к появлению самопроизвольных флуктуаций структуры глобулярных белков в воде под действием энергии теплового возбуждения — конформационной подвижности нативной структуры белка, т. е. к динамической структуре белка, регистрируемой с помощью самых различных методов [157, 80, 12, 225, 296, 306]. При этом динамическая структура является особенно чувствительным показателем равновесия сил в пределах макромолекул, поскольку для изменения частоты какого-либо движения на порядок энергия активации для него должна измениться менее чем на 1,5 ккал/моль. Этому вопросу, непосредственно связанному с особенностями функционирования глобулярных белков, да и других биологических структур, будет посвящена отдельная глава.

Требования к равновесию сил как необходимому условию для функционирования глобулярных белков обуславливают и существование непосредственной связи между теплостойкостью белков из организмов с непостоянной температурой тела и температурой среды их обитания [58]. Это показывает, что обеспечение избирательности биологиче-

ских реакций и возможности управления ими является для организма настолько важным фактором, что организм готов платить за него низкой стабильностью выполняющих подобные функции глобулярных белков.

2.6. О самоорганизации и стабильности структуры белков в воде

На проблеме самоорганизации структуры глобулярных белков, а также их стабильности в условиях, когда для выполнения своих биологических функций они должны реагировать на слабые воздействия, следует остановиться особо. Полипептидная цепь минимального белка из 100 аминокислотных остатков может принимать порядка 10^{100} возможных конформаций. И если бы она состояла из одинаково связанных участков, то цепь не смогла бы организовать в определенную пространственную структуру, так как даже за миллиард лет происходит лишь 10^{30} тепловых колебаний. Уже это определяет необходимость существования в макромолекулах белков участков с относительно прочными внутри- и межцепочечными связями, обусловленными ближними и средними взаимодействиями. К ним относятся прежде всего участки с α -спиральной структурой, которые, как уже отмечалось, могут встречаться почти в любой произвольной последовательности аминокислот и, по-видимому, должны играть ведущую роль в процессах формирования нативной структуры белковых глобул на начальных этапах организации [247, 199]. Подобные участки с относительно жесткой структурой, очевидно, выполняют также функции поддержания нативной структуры макромолекул, создавая определенный барьер для ее необратимых нарушений и допуская изменение конформации (вследствие тепловых флуктуаций или в ходе процессов функционирования) лишь в некоторых пределах. Это позволяет также рассчитывать на сохранение в определенных условиях близкой к нативной конформации белков при их нахождении в неводной среде. Важность сохранения такого рода структур для обеспечения устойчивости общей конформации белков подчеркивается тем обстоятельством, что тепловая денатурация обратима, пока она не доведена до некоторых критических температур, при которых, по-видимому, еще сохраняются участки с жесткой структурой. После же перехода через эти температуры заметно уменьшается доля нативной конформации в процессе ренатурации белков [193].

Таким образом, необходимость решения противоречивых, а зачастую и взаимоисключающих задач по обеспечению активного функционирования белков и сохранения на некоторый минимальный срок их нативной структуры обуславливает гетерогенность структуры бел-

ковых макромолекул. Подобная гетерогенность подтверждается также значительными различиями плотности в пределах белковых глобул с характерным размером структурной неоднородности, превышающим $0,2 \text{ нм}^3$ [175], и различием плотности от $0,5$ до 3 г/см^3 [315]. Гетерогенность проявляется и в доменной структуре белков, причем активный центр обычно располагается на границе двух структурных доменов [247].

С гетерогенностью структуры белков как условием выполнения ими своих биологических функций, возможно, связаны требования к минимальному размеру белков. По Ламри, белком считается полипептид, содержащий более 100 аминокислотных остатков и находящийся в водной среде [152]. Этому сопутствует появление нового качества для белков с молекулярной массой более 11 тыс. Да, соответствующей такому числу остатков. Для таких белков доля водородных связей на единицу объема примерно одинакова [337], тогда как в изученных полипептидах доля подобных связей уменьшается в 1,5 раза [231]. Сопоставление теоретических и экспериментальных данных по структуре полипептидов показывает, что в них ведущую роль играют ван-дер-ваальсовы взаимодействия и эффекты плотной упаковки [190]. Но достижение комплементарности между взаимодействующими друг с другом граничными поверхностями структур, состоящих из неодинаковых элементов, часто происходит за счет смещения несовпадающих между собой частей за пределы поверхности контакта. При дальнейшем же увеличении объема макромолекул достижение соответствия между уже сформированными подобными участками и последующими участками полипептидной цепи становится весьма сложной задачей, что должно ограничивать размер плотно упакованных структур в макромолекулах. На наличие определенных ограничений на размер доменов, как сверху, так и снизу, для обеспечения их устойчивости указывают те же термодинамические данные [193].

В результате создаются предпосылки для того, что, начиная с некоторого минимального объема макромолекулы, ее структура становится гетерогенной. При этом свободные объемы в пределах глобулы могут заполняться молекулами воды, а при отсутствии плотных контактов между граничными поверхностями появляется возможность для формирования направленных водородных связей с максимальной энергией, что приводит к увеличению их доли в белках по сравнению с полипептидами. В свою очередь рост объема макромолекул должен приводить к увеличению возможного вклада слабых взаимодействий в их пределах при изменении конформации белковых глобул и структуры окружающей воды в проводимые с их участием биологические реакции. Наличие значительного объема у макромолекул белков существенно также для регуляции процессов на клеточном уровне, что мы рассмотрим позднее.

Таким образом, на определенном этапе увеличения объема макромолекул, по-видимому, происходит качественный переход от полипептидов, выполняющих, как правило, лишь вспомогательные функции по стимулированию или ингибированию биологических реакций, к новому уровню — белкам, в которых на основе равновесия сил с участием воды создаются условия для избирательности биологических процессов и непосредственного управления ими. Данные факторы, по-видимому, должны влиять также на эффективность биологических реакций. Одновременно за счет наличия в макромолекулах более жестко связанных участков белковая глобула становится устойчивой к относительно небольшим воздействиям, обеспечивая возможность возвращения к исходному состоянию после не слишком больших изменений конформации в ходе процессов функционирования или под действием различных возмущающих факторов.

Однако при выходе за допустимые пределы изменения конформации белок уже не способен справляться со своими функциями, что может привести к нарушению нормального метаболизма. Как известно, для устранения таких нарушений в клетках имеется система протеолитических ферментов, каждый из которых избирательно воздействует на определенную последовательность аминокислот. В норме данные последовательности обычно находятся внутри белковых глобул, и в клетках они становятся доступными для протеолиза, по-видимому, за счет тепловых флуктуаций макромолекул. Подобная система позволяет с большей скоростью устранять белки с нарушенной структурой по сравнению с нативными белками, что наряду с биосинтезом является важным фактором регуляции количества белков в клетке, нужных для функционирования, фактически определяя время их жизни [58]. Она позволяет также в основном устранять возможные ошибки биосинтеза. Вероятность таких ошибок при биосинтезе белков довольно велика и, по некоторым оценкам [235], составляет около 10^{-4} . Появление таких ошибок будет в большинстве случаев нарушать пространственную структуру белковой глобулы, что делает ее более доступной для протеолиза и последующего элиминирования с большей скоростью по сравнению с нормой.

Таким образом, возникает еще одна парадоксальная ситуация: контроль за состоянием белков и ограничение времени жизни для многих из них на основе важной характеристики белковых макромолекул — их чувствительности к слабым воздействиям в водной среде — представляет также один из регуляторных механизмов клетки, что является необходимым условием для сколько-нибудь длительного существования живых систем и обеспечения их воспроизводства.

Все приведенные результаты вполне соответствуют представлениям, что наличие равновесия сил в пределах белковых макромолекул, в дости-

жении которого решающее значение имеет их взаимодействие с водой, — это необходимое условие для обеспечения нормального функционирования белков и их воспроизводства в процессах биосинтеза. Наличие подобного равновесия определяет участие всей глобулы в целом в биологических реакциях, открывая пути для использования различных видов регуляции, в том числе аллостерического, а также протеолиза и других, которые будут рассмотрены позднее, при обсуждении следующих уровней организации живых систем.

Малая величина воздействий, необходимых для смещения равновесия и управления биологическими реакциями, существенно затрудняет их количественную оценку на основе учета различных видов взаимодействий в пределах белковых макромолекул. И хотя многие белки с разными функциями похожи друг на друга, по-видимому, не это сходство, а относительно небольшие различия определяют их специфичность. Оценка таких различий требует использования других методов, непосредственно связанных с возможностью определения равновесия сил. Особый интерес в этом отношении представляет изучение разностных эффектов, относящихся к поискам связи между структурой и функцией различных белков на основе сопоставления данных по динамической структуре макромолекул. Последняя весьма чувствительна к равновесию сил и изменению вклада от воды и других видов взаимодействий, поскольку изменение энергии связи лишь на 1,5 ккал/моль меняет частоту какого-либо вида движения на порядок. Поэтому исследование динамической структуры белковых макромолекул в водной среде позволяет рассчитывать на выяснение возможной связи между данной характеристикой структуры и биологической функцией различных глобулярных белков и непосредственно роли равновесия сил в биологических процессах.

ГЛАВА 3

Динамическая структура глобулярных белков и ее связь с функциональными характеристиками белков

3.1. Введение

Данные по пространственной структуре белков в кристаллическом состоянии позволяют получить лишь общее представление об их реальной структуре в водной среде и о связи особенностей этой структуры с механизмами функционирования белковых макромолекул. Здесь имеется в виду, прежде всего, появление в воде динамической структуры глобулярных белков, которая отражает наличие равновесия сил в пределах белковых макромолекул, необходимое для управления биологическими процессами и для их избирательности. С нею ряд авторов связывает также высокую эффективность биологических реакций, в первую очередь реакций ферментативного катализа [73, 95, 140, 209].

Предполагается, что многие особенности процессов функционирования белковых макромолекул в водной среде могут быть объяснены на основе существования у них большого числа быстро меняющихся конформаций из-за конформационной подвижности белков в воде. Впервые представления о конформационной подвижности были введены для объяснения способности транспортных белков связывать и переносить разнообразные вещества [308]. С внутренней динамикой белков, как отмечалось, связывают также механизм действия протеолитических ферментов [140]. Но особое внимание динамическая структура белков привлекает в связи с попытками объяснения на ее основе высокой эффективности ферментативного катализа. Согласно оценкам, приводимым Волькенштейном для двух гипотетических реакций с двумя субстратами, разрыв между реальной и рассчитываемой на основе известных ранее физико-химических факторов скоростью катализа достигает 9–12 порядков [94]. Поэтому такой интерес вызывают поиски возможных физических механизмов, которые могли бы устранить подобный разрыв.

Представления о конформационной подвижности белков в применении к процессам ферментативного катализа используют, прежде всего, при обсуждении вопросов стереохимического соответствия между ферментом и субстратом, которое наблюдается не только в ходе образования фермент-субстратного комплекса [140], но и на других стадиях ферментативного катализа [152, 324]. При рассмотрении энергетических аспектов ферментативного катализа обсуждается возможность снижения энергетического барьера реакции за счет использования энергии колебаний белковой глобулы в целом [151, 240, 246] и ее деформации, включая переход в энергию колебаний энергии сорбции субстрата в активном центре белка [240]. Однако в последующем было показано, что колебания глобулы как целого должны быстро затухать в вязкой водной среде [95]. Кроме того, на этой основе трудно обеспечить избирательность и регуляцию реакций ферментативного катализа.

Другой подход к данной проблеме связан с использованием эффектов конформационной динамики белков [73, 319]. Предполагается, что конформационная подвижность в макромолекулах ферментов может влиять на выравнивание профиля свободной энергии ферментативной реакции [152, 324], она должна играть важную роль в процессах релаксации фермент-субстратного комплекса к новому равновесному состоянию [73] и влиять на вероятность электронных переходов в макромолекулах (теория электронно-конформационных взаимодействий [95] и т.д.). Как уже отмечалось, конформационная динамика белков является также отражением их способности к регулированию биологических процессов и их избирательности.

3.2. Динамическая структура белков и методы ее изучения

Существование динамической структуры у глобулярных белков в воде в настоящее время не вызывает сомнений, оно нашло непосредственное подтверждение в экспериментах с использованием ряда прямых и косвенных методов. Особое место среди них занимает метод изотопного обмена, данные которого длительное время служили основным подтверждением концепции о динамической структуре белков [1, 2, 230]. Для объяснения изотопного обмена протонов NH-групп белка, находящихся внутри глобулы, было выдвинуто предположение о сегментальной подвижности участков полипептидной цепи, в результате которой эти протоны периодически вступают в контакт с растворителем [1, 230]. Время обмена данных протонов с учетом химических факторов обмена служит для получения количественных характеристик конформационной

подвижности [230]. Однако хотя с помощью метода изотопного обмена получен обширный экспериментальный материал и показана его высокая чувствительность к модификации структуры глобулярных белков, он является лишь косвенным методом регистрации внутреннего движения в белках. Не исключена также возможность альтернативного объяснения (по крайней мере, части полученных результатов) за счет диффузии растворителя в пределах глобулы [230]. Существенно влияет на изотопный обмен и вода, находящаяся внутри макромолекул, тем более, что данные обмена не обнаруживают связи с молекулярной массой белков [1]. Анализ результатов метода изотопного обмена затрудняется и наличием своего времени обмена практически для каждого из протонов имино-групп белка, зарегистрированным методом ЯМР [335].

Другой косвенный метод изучения конформационной подвижности в глобулярных белках — протеолиз — также основан на представлениях о периодической доступности определенных участков полипептидной цепи у субстратного белка, на которые способен воздействовать протеолитический фермент, хотя обычно они находятся внутри макромолекулы [343]. Результаты исследования процессов протеолиза в общем обнаруживают довольно хорошую корреляцию с результатами изучения изотопного обмена [2], причем, несмотря на свои ограниченные возможности в регистрации внутренней динамики, метод оказывается эффективным при сопоставлении данных для модифицированных и нативных белков [58].

Среди прямых физических методов особое значение придается изучению динамической структуры белков методом динамического рентгено-структурного анализа [296]. Именно его результаты способствовали широкому утверждению представлений о динамической структуре белков, но, вместе с тем, они вызвали и целый ряд вопросов. Согласно данным рентгено-динамического анализа белков, определенно регистрируется движение лишь поверхностных групп белка и оно почти не наблюдается во внутренних областях белковых глобул [296]. Эти результаты послужили основой для представлений о кристаллической, а в совокупности с данными низкотемпературных измерений, и о стеклообразной структуре белковой глобулы [102]. Однако при интерпретации данных рентгено-динамического анализа следует учитывать, что с его помощью могут быть зарегистрированы только такие состояния, доля которых от основного структурного состояния составляет, по меньшей мере, несколько процентов и, следовательно, различия между энергетическими уровнями таких состояний не могут превышать 2–3 ккал/моль. Это существенно ограничивает возможности данного метода, и для получения сведений о подвижности внутренних участков макромолекул необходимо использовать другие подходы.

Вопросы распространенности внутреннего движения в макромолекулах глобулярных белков имеют принципиальное значение в связи с обсуждаемыми здесь представлениями о наличии равновесия сил в пределах белковых глобул, находящихся в водной среде. А это предполагает участие в биологических процессах не только активного центра и прилегающих к нему групп, но и всей глобулы в целом. Поэтому методы изучения динамической структуры белков должны дать не только более полные сведения о характеристиках внутреннего движения в пределах макромолекул, но и на этой основе перейти к сопоставлению таких характеристик с функцией белков или других биологических структур.

Среди прямых физических методов исследования конформационной подвижности белков следует отметить методы спиновой метки [157], γ -резонансной метки [142, 225], собственной люминесценции белка [80] и ядерного магнитного резонанса [306, 110]. С помощью этих методов были получены многочисленные прямые подтверждения существования внутреннего движения в белках и изучены его частотные и энергетические характеристики. Однако метод спиновой метки практически чувствителен лишь к частотам движения, превышающим 10^7 – 10^8 Гц [157], что позволяет изучать в основном движение лишь внешних слоев макромолекул белков. И хотя на основе метода спиновой метки предложен ряд подходов для регистрации более медленного движения [153], они пока находят лишь ограниченное применение. Нельзя полностью отвергнуть и возможность эффектов, связанных с искажением структуры отдельных участков макромолекул белка при введении в них метки. Тем не менее, данный метод вполне успешно используют для изучения дифференциальных эффектов, связанных с изменением показателей динамики белков и их функциональных характеристик. Результаты некоторых из таких исследований будут сопоставлены с данными, полученными при использовании других методов изучения динамической структуры белков.

Примерно тот же диапазон частот доступен и для метода γ -резонансной (мессбауэровской) спектроскопии, преимуществом которого является возможность изучения внутреннего движения в железосодержащих белках без введения меток извне, на основе регистрации поглощения, а в любых других объектах при использовании рэлеевского рассеяния мессбауэровского излучения (РРМИ) [142, 225]. На основе этих методов были получены сведения как о частотных, так и об амплитудных характеристиках внутреннего движения в ряде макромолекул белков в присутствии воды. Но недостатком методов γ -резонансной спектроскопии является не только ограниченный диапазон исследуемых частот движения, но и зависимость получаемых результатов не только от внутренней динамики, но и от возможного изменения связи между макромолекулами белков или между ними и окружающей средой. Опре-

деленным пределом ограничен и диапазон изучаемой влажности образцов [225].

Еще один метод регистрации внутреннего движения — люминесцентный, имеет те же ограничения в частотной области, что и перечисленные выше методы. Кроме того, он позволяет изучить в основном перестройку белка в окрестности триптофаниловых остатков в наносекундном диапазоне частот [80]. В то же время непосредственные данные о движении триптофанилового остатка могут быть получены при регистрации деполяризации его флуоресценции [318, 144, 226], хотя и здесь есть свои трудности, связанные с эффектами миграции энергии между этими остатками [80].

Поэтому особый интерес вызывает использование метода ядерного магнитного резонанса для исследования конформационной подвижности глобулярных белков, с тем, чтобы перейти от констатации самого факта ее существования к исследованию количественных характеристик подвижности в связи с особенностями структуры различных участков макромолекул белков и их функциональными свойствами.

3.3. Метод ЯМР в исследовании динамики белков

Известно, что метод ЯМР в приложении к макромолекулам биополимеров позволяет получить обширную информацию об их химической и пространственной структуре, сопоставимую по своим потенциальным возможностям с данными рентгеноструктурного анализа, но относящуюся не к кристаллическому состоянию, а к макромолекулам в водной среде [306, 110]. Достоинством метода ЯМР является также возможность его регистрации непосредственно от ядер, входящих в состав макромолекул биополимеров: ядер водорода ^1H , ^2H ; углерода ^{13}C ; азота ^{14}N , ^{15}N , фосфора ^{31}P и других, независимо от магнитных свойств самих макромолекул и без введения каких-либо меток, в той или иной степени влияющих на их структуру. Существенное значение имеют и сравнительно низкие частоты исследуемых переходов в ЯМР — на 3 порядка ниже частот переходов в ЭПР и на многие порядки ниже частот оптических переходов. В результате возможно изучение динамических свойств макромолекул биополимеров или их отдельных групп в диапазоне частот, обычно недоступных для упомянутых выше методов.

Теория эффектов внутреннего движения в макромолекулах белков в воде основана на зависимости времени спин-решеточной релаксации T_1 и спин-спиновой релаксации T_2 для магнитных моментов исследуемых ядер, а также ядерного эффекта Оверхаузера для них от характеристического времени корреляции τ_c для движения белковых глобул, и с учетом

наложения на него различных видов внутреннего движения с отличными друг от друга временами корреляции [5, 110, 217]. Для случая единственного времени корреляции τ_c для изотропного движения при взаимодействии между одинаковыми магнитными моментами теория дает следующие выражения:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{2}{5} (\gamma^4 h^2 / r^6) I(I+1) \left[\frac{\tau_c}{(1 + \omega_0^2 \tau_c^2)} + \frac{4\tau_c}{(1 + \omega_0^2 \tau_c^2)} \right],$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{5} (\gamma^4 h^2 / r^6) I(I+1) \left[\frac{3\tau_c + 5\tau_c}{(1 + \omega_0^2 \tau_c^2)} + \frac{2\tau_c}{(1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2)} \right],$$

где I — спин ядра, γ — гиромагнитное отношение для данного ядра, h — постоянная Планка, r — расстояние между взаимодействующими магнитными моментами ядер, ω_0 — частота резонанса. Из этих соотношений видно, что $1/T_2$ линейно зависит от τ_c в диапазоне его значений от 10^{-5} с, определяемого шириной резонанса для «жесткой» решетки, вплоть до 10^{-12} с, наблюдаемого в подвижных жидкостях. Такая же зависимость при коротких τ_c наблюдается и для $1/T_1$, причем здесь $T_1 = T_2$. Для T_1 характерно наличие минимума вблизи $\tau_c = I/\omega_0$, т.е. когда частота внутреннего движения совпадает с частотой резонанса. В области низких частот движения T_1 всегда больше T_2 [110].

Более сложным является учет внутреннего движения при наличии нескольких видов движения и вращения самой белковой макромолекулы в воде. Тем не менее, рассмотрение различных моделей внутреннего движения [306], а также безмодельные расчеты [320, 321] при некотором отличии в деталях, позволили получить весьма существенный единый вывод: внутреннее движение вызывает уменьшение эффективного времени корреляции, и оно заметно влияет на релаксационные характеристики, а также на величину ядерного эффекта Оверхаузера в том случае, когда частоты вращения молекулярных групп превышают частоту вращательного диффузионного движения белковой глобулы в воде. При превышении частот вращательного движения молекулярных групп над частотой вращения глобулы происходит переход к новому значению T_2 , которое уже слабо меняется при дальнейшем росте частот внутреннего движения [320, 321].

Вместе с тем, значительно более низкие частоты внутреннего движения могут быть зарегистрированы при проведении экспериментов во вращающейся системе координат, где значения определяемых частот движения зависят не только от частоты резонанса, но и от во много раз меньшей величины ω_1 , соответствующей амплитуде вращающегося

радиочастотного поля H_1 , ($\omega_1 = \gamma H_1$) [110]:

$$\frac{1}{T_{1\rho}} = C \left[\frac{3\tau_c}{(1 + 4\omega_1^2\tau_c^2)} + \frac{5\tau_c}{(1 + \omega_0^2\tau_c^2)} + \frac{2\tau_c}{(1 + 4\omega_0^2\tau_c^2)} \right],$$

где $T_{1\rho}$ — время спин-решеточной релаксации во вращающейся системе координат, C — постоянный множитель. В случае $T_1 \gg T_2$, обычно наблюдаемом при регистрации ЯМР в макромолекулах белков, в данном выражении остается лишь первый член, зависящий от низких частот движения. Измерение $T_{1\rho}$ в зависимости от величины H_1 позволяет обнаружить низкие частоты внутреннего движения (обычно 10^5 – 10^6 с⁻¹).

Еще более низкие частоты внутреннего движения, вплоть до сотен и десятков герц, могут быть зарегистрированы по исчезновению расщепления, связанного с различием химических сдвигов в разных положениях протонов по спектрам ЯМР высокого разрешения [9, 306]. Спектроскопия ЯМР высокого разрешения наиболее широко используется для оценки подвижности отдельных молекулярных групп в белках на основе измерений T_1 для соответствующих этим группам линий в спектрах от протонов или ядер ¹³C для белков в растворах. Однако спектры ЯМР от белков содержат многие сотни линий, и, несмотря на существенный прогресс в экспериментальной технике и разработку новых методических подходов, основная масса линий в спектрах ЯМР для белков остается неразрешенной. Это не позволяет получить сколько-нибудь полную картину внутренних движений в пределах белковых глобул, не говоря уже о том, что спектры ЯМР высокого разрешения обычно наблюдаются на частотах порядка 10^9 с⁻¹ и от относительно небольших белков, высокая подвижность которых в воде приводит к заметному сужению резонансных линий. Но та же подвижность макромолекулы ограничивает область исследуемых частот внутреннего движения, которые должны обычно превышать 10^8 с⁻¹ [320, 321].

Данные спектроскопии ЯМР высокого разрешения, в общем, подтвердили наличие вращательных движений со скоростями, превышающими скорость вращения белковых глобул, для ряда групп, в первую очередь расположенных вблизи поверхности макромолекул в водном растворе. Однако эти данные относятся к сравнительно небольшому числу остатков, и на их основе нельзя сделать вывод о распространенности таких движений в пределах глобулы. Зарегистрированы также быстрые вращения метильных групп в объеме глобулы и высокочастотные либрационные движения участков полипептидной цепи [320, 321]. В ряде случаев удалось наблюдать вращательные движения ароматических аминокислотных остатков с частотами, существенно ниже частот вращения

белковых глобул [9, 306]. Однако какой-либо связи между динамическими и функциональными характеристиками белков в воде, исключая изменение подвижности непосредственно взаимодействующих с субстратом или другими соединениями групп, установить не удалось.

3.4. Исследование динамики белков методом спинového эха ЯМР

Использование импульсных методов ЯМР, в первую очередь метода спинového эха, позволило реализовать другие подходы к изучению конформационной подвижности в белках и ее связи с биологической функцией различных биополимеров [12]. С помощью этих методов были выполнены исследования суммарных кривых восстановления продольной намагниченности, в том числе во вращающейся системе координат, для протонов различных белков. Целью работы было выявление общего вклада внутреннего движения в процессы спин-решеточной релаксации и выделение отдельных видов такого движения, если их частоты, при изменении условий эксперимента, совпадут с частотой резонанса.

Данные кривые для протонов белков в D_2O или для кристаллов или порошков белков довольно хорошо описывались единой экспонентой (исключая белки, содержащие парамагнитные атомы). Это связано с влиянием процессов спиновой диффузии между большинством протонов белка, а в порошках и кристаллах — также воздействием протонов кристаллизационной и гидратной воды [48], что подтверждается и другими авторами [267]. Поэтому для устранения влияния протонов воды на релаксацию протонов белков порошки белков получали лиофилизацией из растворов белков в тяжелой воде. Наличие единой экспоненты позволило приписать каждой кривой единое значение T_1 практически для всех протонов определенного белка.

Измеренные значения T_1 для протонов белков в воде зависят как от вращательного диффузионного движения самих белковых глобул, так и от наличия внутреннего движения в пределах макромолекул. Замедление движения глобул в воде при повышении массы белка (рис. 9) или вязкости растворов (рис. 10) или при переходе к высоким концентрациям белка приводит к некоторой постоянной величине T_1 для протонов белков, определяемой лишь внутренним движением [47]. Для выделения вклада различных видов внутреннего движения были изучены температурная и частотная зависимости T_1 для протонов некоторых белков.

Одним из видов внутреннего движения является вращение практически всех метильных групп, которое определяет минимум T_1 для протонов сывороточного альбумина при температуре около $-100^\circ C$ на ча-

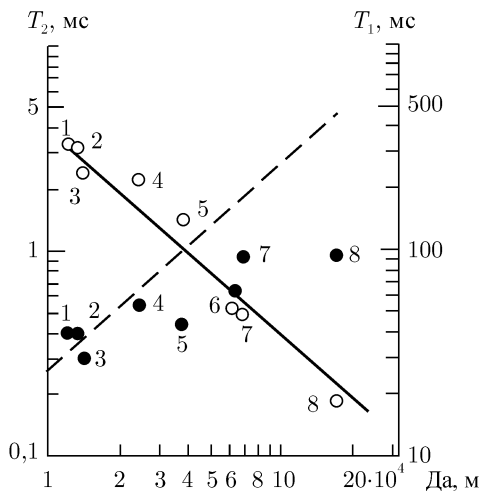


Рис. 9. Зависимость T_1 для протонов глобулярных белков и T_2 для быстрого компонента спада спинового эха от протонов в 3–5% растворах белков в D_2O от молекулярной массы белков: 1 — цитохром С; 2 — РНКаза; 3 — лизоцим; 4 — химотрипсин; 5 — ДНКаза; 6 — гемоглобин; 7 — СА; 8 — иммуноглобулин. Прямые соответствуют теоретической зависимости для T_1 (пунктир) и T_2 (сплошная линия) при учете лишь движения глобулы как целого [47]

стоте 20 МГц (рис. 11). Подобный же минимум, смещенный при более высоких частотах резонанса в сторону более высоких температур, наблюдается для ряда полипептидов и белков [268, 267]. Минимум вблизи -100°C имеет практически одинаковую глубину в высушенном из D_2O порошке СА и в его 50%-ном растворе в D_2O , что указывает на слабую зависимость вращения метильных групп, практически не требующих для этого наличия в макромолекуле свободных объемов, от оводненности белка.

Следовательно, данный вид движения не связан с конформационной динамикой белков. Другие же виды внутреннего движения в сухом белке не наблюдаются даже при повышении его температуры до 50°C (рис. 12). Это соответствует и данным других методов, в частности, γ -резонансной метки [225] и люминесцентных методов [80].

В оводненном же сывороточном альбумине, начиная с -60°C , наблюдается постепенное уменьшение значений T_1 , которые достигают минимума вблизи 0°C . Совершенно аналогичная картина при отрица-

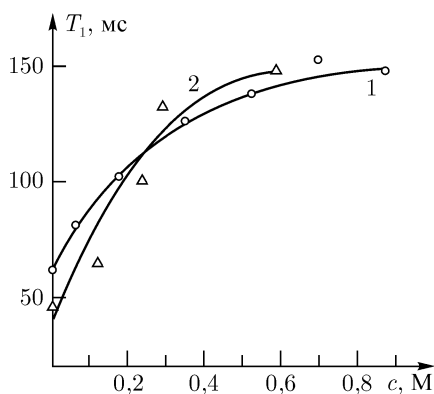


Рис. 10. Зависимость T_1 для протонов РНКазы (1) и лизоцима (2) от концентрации сахарозы в 10 %-ых растворах белков в D_2O на частоте 20 МГц [47]

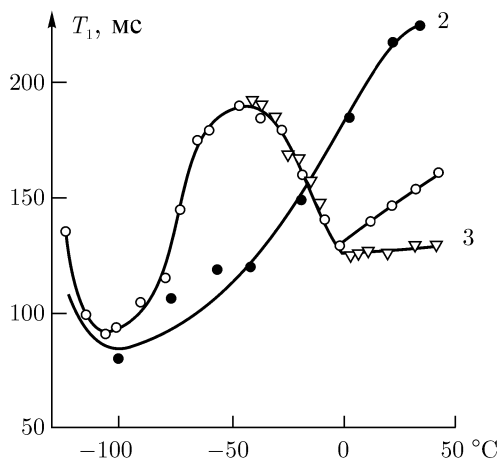


Рис. 11. Температурная зависимость T_1 для протонов белков в 50 %-х растворах СА (1) и РНКазы (3) в D_2O и в лиофилизированном из раствора в D_2O порошке СА на частоте 20 МГц [48, 12]

тельных температурах регистрируется и для 50 %-ного раствора рибонуклеазы в D_2O (см. рис. 12). Эти данные указывают на наличие других видов внутреннего движения, причем появлению подвижности групп белка предшествует регистрация подвижности молекул воды, минимум T_1 для протонов которой на частоте резонанса 60 МГц находится примерно при $-40^\circ C$ [267].

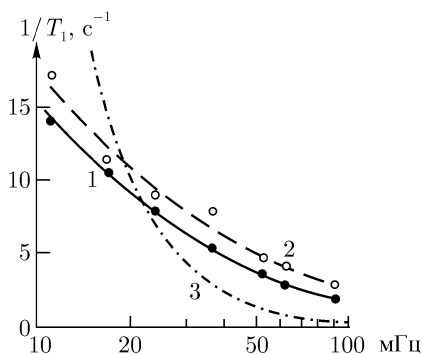


Рис. 12. Частотная зависимость T_1 для протонов СА (1) и РНКазы (2) в 50 %-ных растворах белков в D_2O кривая 3 соответствует теоретической зависимости, построенной в предположении о единственном значении времени корреляции для движения, определяющего величину T_1 для протонов белков [12]

липептидной цепи составляет более 30° и такие движения происходят примерно в половине объема макромолекул СА и РНКазы [12, 48]. Эти результаты находятся в соответствии с данными наблюдения мелкомасштабной подвижности триптофаниловых остатков в белках в наносекундной области [144, 145, 318].

Наличие внутреннего движения в белках в наносекундной области частот непосредственно подтверждается регистрацией значительной дисперсии T_1 для протонов тех же белков в воде при изменении частоты резонанса от 10 до 90 МГц (рис. 12), которая заметно отличается от теоретической кривой для единственного времени корреляции [12]. Здесь следует отметить более высокую интенсивность внутреннего движения при данных частотах резонанса для фермента РНКазы по сравнению с СА.

Следовательно, наличие воды обуславливает появление еще одного вида внутреннего движения в белках, которое, по-видимому, относится к колебательным движениям боковых групп полипептидной цепи с частотами ниже $10^8 s^{-1}$ при отрицательных температурах и заметно выше этой величины — при положительных. Точную глубину фазовый переход для воды. В то же время T_2 для протонов воды в данной области температур не испытывает заметных изменений [280], что легко объяснимо существенным различием скоростей релаксации, которая для T_1 составляет лишь $1/10000$ от той же величины для T_2 . Оценки показывают, что, исходя из величины T_1 вблизи минимума, амплитуда колебательных движений боковых групп поли-

Использование методики измерений во вращающейся системе координат позволило выявить еще одну область частот внутреннего движения для белков в воде — 10^5 – 10^6 с $^{-1}$, где наблюдается заметная дисперсия величины $T_{1\rho}$ для протонов СА в 20%-ном растворе этого белка в D₂O (рис. 13 а). Подобные движения, по-видимому, относятся к вращению отдельных боковых групп полипептидной цепи. В то же время для фермента РНКазы такие низкочастотные движения не наблюдаются, на что указывает совпадение кривых при разных значениях ω_1 в данном частотном диапазоне (рис. 13 б) [50].

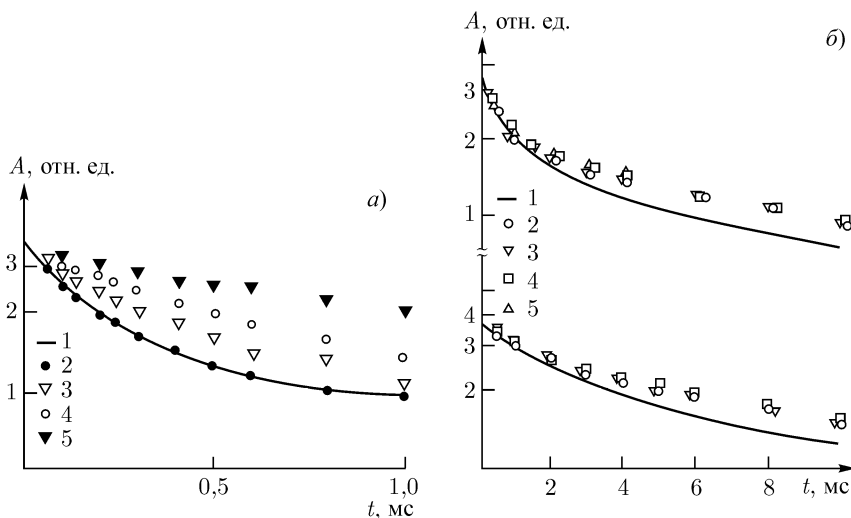


Рис. 13. Кривые спада спинного эха от протонов (1) и продольной намагниченности во вращающейся системе координат при различных значениях напряженности переменного магнитного поля H_1 : (2–4 гс, 3–6 гс, 4–20 гс, 5–40 гс) для протонов СА в 20%-ном растворе белка в D₂O на частоте 20 МГц (а) и для протонов РНКазы в 30%-ных (вверху) и 20%-х (внизу) растворах белка в D₂O на частоте 20 МГц (б) [50]

Для РНКазы, как следует из рис. 12, регистрируется более высокая, по сравнению с СА, скорость релаксации в области 10–90 мГц. Кроме того, для РНКазы наблюдается более слабая зависимость от температуры при положительных ее значениях, что свидетельствует о возможной близости еще одного минимума T_1 , соответствующего другому виду

внутреннего движения с частотой, приближающейся к 10^8 с^{-1} . Такого рода данные, указывающие на более интенсивное внутреннее движение в случае фермента РНКазы по сравнению с транспортным белком СА, получили дополнительное подтверждение при сопоставлении кривых спада спинового эха для протонов 12 глобулярных белков в воде и при их анализе [49].

Исследование кривых спада спинового эха позволяет получить сведения о распределении значений T_2 для различных протонов в пределах белковых глобул, независимо от перекрывания большинства линий в сложных спектрах ЯМР от белков, поскольку результаты метода спинового эха нечувствительны к различию химических сдвигов для отдельных молекулярных групп и к неоднородности магнитной восприимчивости в пределах макромолекул [110]. На значения T_2 практически не влияют и процессы спиновой диффузии, приводившие к усреднению значений T_1 для протонов в пределах белков и затруднявшие исследование их распределения.

Кривые спада спинового эха от протонов белков в воде имеют сложный характер и их анализ будет проведен позднее. Но при выполнении сравнительных исследований можно избежать трудностей, связанных с анализом таких кривых. Для выделения эффектов внутреннего движения необходимо лишь учесть различие кривых спада, связанное с разными частотами вращательного диффузионного движения белковых глобул в воде. Известно, что средний аминокислотный состав [167] и плотность для различных глобулярных белков в воде [119] близки друг к другу. Для белков с молекулярной массой до 1 млн Да $1/T_2$, в соответствии с теорией ЯМР для жидкостей [5, 110, 217], пропорционально τ_c — времени корреляции для вращательного диффузионного движения белковых глобул в воде, которое замедляется пропорционально массе глобулы (если пренебречь эффектами отличий формы белковых глобул). Отсюда следует, что $1/T_2 = C \times M$, где C — постоянный множитель, который не зависит от массы глобулы M . Такая же зависимость будет наблюдаться и для сложной кривой спада, которая всегда может быть записана в виде суммы ряда экспонент, причем такая кривая при умножении времени спада t_c на массу глобулы M не должна зависеть от различий в массах белков.

При построении нормированных по амплитуде кривых спада спинового эха от протонов 11 глобулярных белков в D_2O в подобном масштабе они могут быть разделены на 3 группы (рис. 14). К наиболее быстро спадающей группе принадлежат кривые для всех четырех изученных неферментных белков: цитохрома С, гемоглобина, СА и иммуноглобулина. Все они примерно совпадают между собой, исключая некоторые отклонения на хвосте кривой для гемоглобина, имеющего субъединичную

структуру. Другую группу близко расположенных друг к другу кривых, лежащих заметно выше первой группы, составляют кривые спада эха для протонов всех пяти изученных мономерных ферментов: лизоцима, РНКазы, ДНКазы, химотрипсина и пероксидазы. Различие между указанными группами кривых в интервале значений $(t \times M)$ от 70 до 180 ($c \times Da$) более чем в 3 раза превышает суммарный среднеквадратичный разброс в пределах обеих групп кривых. Наконец, еще выше расположены кривые спада для субъединичных ферментов — гексокиназы и алкогольдегидрогеназы из дрожжей, на которые влияет присутствие, соответственно, двух и четырех изолированных субъединиц у данных относительно слабо связанных белков [49, 12].

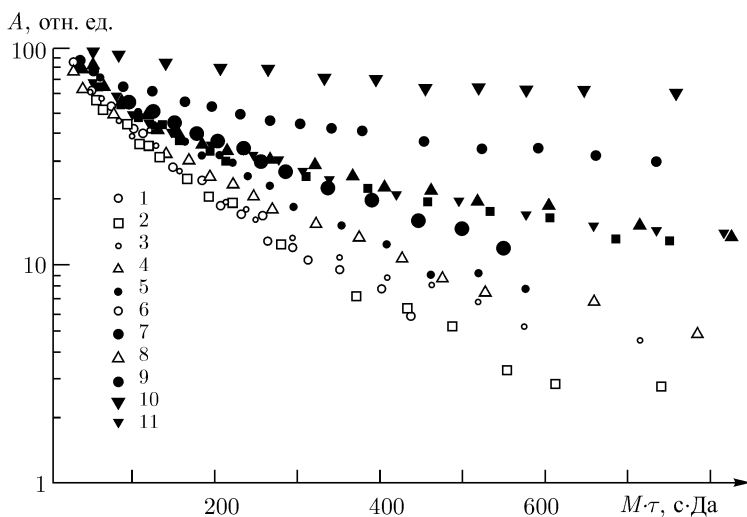


Рис. 14. Нормированные по амплитуде и приведенные к единой молекулярной массе кривые спада спинového эха от протонов различных глобулярных белков в их 3–5 %-ных растворах в D_2O . Значки, относящиеся к ферментам, зачернены. 1 — питехром С; 2 — иммуноглобулин, 3 — СА; 4 — гемоглобин; 5 — лизоцим; 6 — РНКаза; 7 — ДНКаза; 8 — химотрипсин; 9 — гексокиназа; 10 — алкогольдегидрогеназа; 11 — пероксидаза [49]

Следовательно, кривые для всех изученных ферментов спадают значительно медленнее по сравнению с кривыми для всех изученных неферментных белков. Аналогичный результат получен также при сравнении кривых спада для протонов от химотрипсина и его предшественни-

ка — химотрипсिनогена, не обладающего ферментативной активностью (рис. 15) [47]. Наблюдаемое замедление, учитывая близость аминокислотного состава и плотности для обеих групп белков [167, 119], нельзя объяснить различием локальных полей в пределах макромолекул. Единственно возможное его объяснение связано с эффектами более интенсивного внутреннего движения в пределах макромолекул ферментов по сравнению с неферментными белками, к которым у субъединичных белков добавляются эффекты взаимного движения слабо связанных между собой субъединиц. О более интенсивном внутреннем движении у ферментов свидетельствуют и приведенные выше результаты сопоставления характеристик процессов спин-решеточной релаксации для протонов в СА и РНКазе.

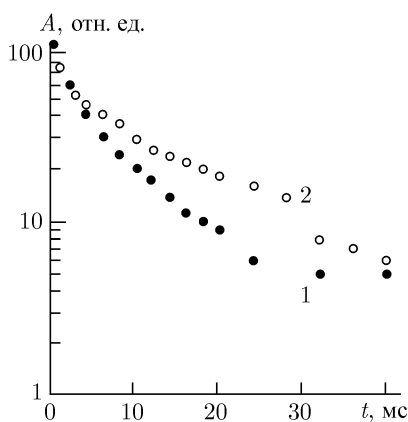


Рис. 15. Кривые спада спинового эха от протонов химотрипсिनогена (1) и химотрипсина (2) в 5%-ных растворах белков в D_2O . Для предотвращения автолиза раствор химотрипсина имеет рН 4,0 [258]

компонент от боковых групп белка, движение которых имеет более высокую температурную зависимость по сравнению с движением других групп белка и глобулы в целом. После учета вклада от боковых групп макромолекул, составляющего около 10% от общей амплитуды сигнала, кривые спада спинового эха от протонов белков в D_2O могли быть разделены на два примерно одинаковые по амплитуде компонента с отношением времен релаксации для медленного и быстрого компонентов 4–5 в случае

Вместе с тем, необходимо объяснить не только различия между группами кривых для ферментов и неферментных белков, но и их близость между собой в пределах каждой из групп, что потребовало анализа формы кривых спада спинового эха. Наблюдаемые сложные кривые спада формально могут быть разделены на 2 компонента с экспоненциальным законом спада — быстрый, относящийся к сравнительно малоподвижным областям макромолекулы, и медленный, отвечающий более подвижным группам. Однако при таком разложении доля медленного компонента и, соответственно, доля подвижных групп уменьшаются при повышении температуры, что противоречит здравому смыслу. В этой связи предположили, что наблюдаемый эффект обусловлен частичным вкладом в медленный компонент

неферментных белков (рис. 16) и около 8 для ферментов [47]. Соотношение амплитуд этих компонентов сохранялось при изменении концентрации белков и температуры в широких пределах, например, для СА от 5% до 22% концентрации и от 4 до 39° С [51], что свидетельствует об их физической значимости. Последнее подтверждалось также тем, что полученные на конечных этапах разложения значения T_2 для протонов быстрых компонентов спада от различных белков, относимых к их жесткосвязанным участкам, в соответствии с теорией с хорошей точностью убывали пропорционально молекулярной массе белковых глобул (см. рис. 9) [47] (исключая слабосвязанные субъединичные белки).

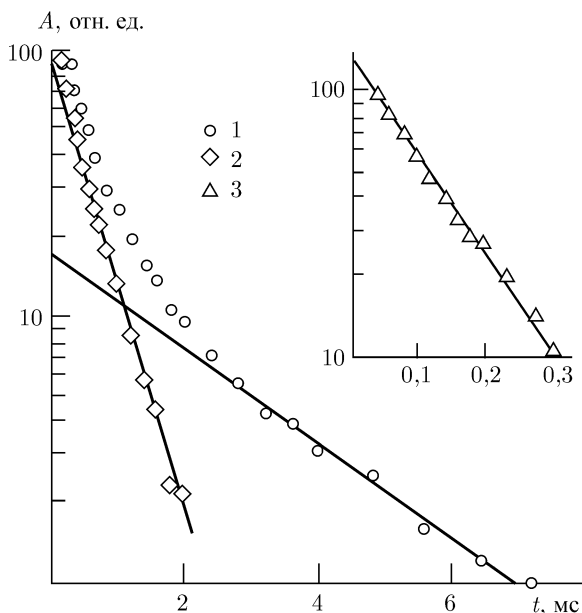


Рис. 16. Кривая спада спинного эха от протонов СА человека в 10%-ном растворе белка в D_2O и ее разложение на компоненты: 1 — медленный компонент спада; 2 — промежуточный компонент; 3 — быстрый компонент спада [47]

Результаты разложения были сопоставлены и с известными данными по аминокислотному составу белков [167]. В усредненном по составу белке около 30% протонов принадлежат к CH_3 -группам, 42% — CH_2 , 20% — CH и остальные к протонам ароматических групп (про-

тоны NH-групп в D_2O обмениваются на дейтерий и не вносят вклад в резонанс). Расстояние между протонами в метильных и метиленовых группах составляет 0,178 нм, а между СН-протонами в пределах глобулы около 0,25 нм. Учитывая зависимость T_2 от шестой степени расстояния между протонами [5], получим отличие значений T_2 для протонов СН-групп от их значений для CN_2 -групп в 6–7 раз [12]. Значения T_2 для протонов метильных групп из-за их быстрого вращения меняются в 4 раза [110]. Среднее от суммы близко к 5, что вполне объясняет результаты разложения кривых спада для протонов от неферментных белков, в предположении, что частоты внутреннего движения в них ниже частот вращения белковых глобул. Последнее соответствует результатам измерений во вращающейся системе координат.

В случае ферментов, согласно тем же измерениям для РНКазы, частоты внутреннего движения превышают частоту вращения белковых глобул, что, в соответствии с данными расчетов, должно приводить не к непрерывному изменению T_2 , а к его относительно резкому переходу к новому значению. На этой основе полностью объясняется не только отличие кривых для ферментов от кривых для неферментных белков, но и их близость между собой в пределах каждой из групп вследствие относительно высоких и более низких частот внутреннего движения [12].

Выводы о более интенсивном внутреннем движении у ферментов по сравнению с неферментными белками находятся в соответствии с рядом результатов, полученных другими методами. Так сопоставление термодинамических характеристик процессов денатурации для пепсина и пепсиногена указывает на более рыхлую структуру фермента пепсина по сравнению с его предшественником [338].

Такой же вывод следует из сравнения данных по деполяризации флуоресценции остатков триптофана в ряде белков. Хотя вращение остатков триптофана, по данным ЯМР, происходит с весьма малыми частотами [80] из-за их большого размера, требующего для своего вращения значительных свободных объемов в пределах белка, для них возможна высокочастотная мелкомасштабная подвижность. Она должна отражать отмеченные выше колебания боковых групп полипептидной цепи внутри макромолекулы. Возможность появления такой подвижности у остатков триптофана подтверждают расчеты изменений положения молекулярных групп в его окрестности, выполненные для белка азурина [145].

Согласно экспериментальным данным по деполяризации флуоресценции, поворотное движение остатков триптофана у ферментов пепсина, трипсина, химотрипсина, карбоксипептидазы и карбоангидразы характеризуется меньшим временем, а угол поворота в 1,5–2 раза превышает аналогичные показатели для сывороточных альбуминов человека

и быка [144]. На рис. 17 приведены результаты другой работы по деполяризации флуоресценции триптофановых остатков, где за единицу принято значение тангенса угла поворота, обусловленного вращательным диффузионным движением белковой глобулы в воде. Эти данные указывают на наличие связанного с внутренним движением дополнительного смещения угла поворота у ферментов пепсина, лизоцима и трипсина, причем такое движение появляется после активации трипсиногена в трипсин. Дополнительное смещение угла поворота наблюдается также у БСА при pH 2 и у основного белка миелина, тогда как у БСА и САЧ в нейтральной среде такое смещение существенно меньше.

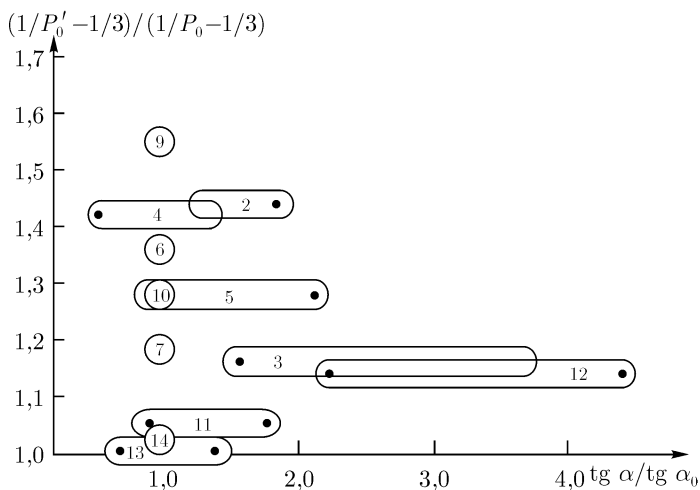


Рис. 17. Характеристики внутримолекулярной подвижности белков, полученные методом вращательной деполяризации флуоресценции: 1 — основной белок миелина; 2 — пепсин; 3 — лизоцим; 4 — трипсиноген; 5 — трипсин; 6 — аспарагиназа; 7 — церулоплазмин; 8 — Z-актин; 9 — F-актин; 10 — инактивированный актин; 11 — БСА, pH 7,5; 12 — БСА, pH 2,0; 13 — СА человека, pH 7,5; 14 — миоцин [144]

Приведенные данные в основном согласуются с данными ЯМР о более интенсивном внутреннем движении в макромолекулах ферментов по сравнению с неферментными белками. И хотя обнаруживаются некоторые отклонения, это не противоречит данному выводу, учитывая гетерогенный характер структуры белков и зависимость полученных результа-

тов от местоположения триптофанового остатка в пределах макромолекулы. В тех же случаях, когда проводятся сравнительные исследования, например, для пары трипсиноген–трипсин методом деполяризации флуоресценции [144] или для пары пепсиноген–пепсин методом калориметрии [338], или пары химотрипсиноген–химотрипсин методом спинного эха ЯМР переход от предшественника фермента к ферменту приводит к появлению у ферментов более высокой подвижности по сравнению с неферментными белками.

Возможность относительно небольших отклонений в структуре между ферментами и неферментными белками, влияющих на равновесие сил в пределах белковых макромолекул, подтверждается данными анализа отклонений от среднего аминокислотного состава для более чем 300 белков. Изображение таких отклонений в 18-мерном пространстве для 18 аминокислот позволило выделить области, преимущественно занимаемые, соответственно, внутриклеточными ферментами и неферментами и внеклеточными ферментами и неферментами [330]. Подобные отклонения в составе, вероятно, приводят к некоторым отличиям в упаковке белковых структур, что, учитывая высокую чувствительность динамики белков к равновесию сил в пределах белковых глобул, вполне может определить наблюдаемые различия характеристик внутреннего движения между ферментами и неферментными белками.

Косвенным показателем внутренней динамики является теплостойкость белков [57]. Сравнение теплостойкости различных белков показывает, что для большого числа ферментов отмечается корреляция между теплостойкостью белков и температурой существования организма, тогда как для неферментных белков, таких, как СА и гемоглобин, теплостойкость заметно выше требуемой по условиям существования. Более стойкими являются и сократительные белки. Правда, высокий уровень теплостойкости отмечен и для отдельных ферментов. Но ведь и эффективность работы различных ферментов, и требования к их избирательности, и общая роль в организме также бывают различными, и не каждый из ферментов, возможно, предъявляет жесткие требования к своей работе.

3.5. Заключение

Таким образом, результаты, полученные с помощью импульсных методов ЯМР, наряду с данными других методов, позволяют сделать вывод, что эффективность функционирования ферментов, включая их избирательность и возможность управления биологическими реакциями, по-видимому, непосредственно связана с динамической структурой белков. Решающее значение в ее появлении имеет взаимодействие белков

с водой, которая, помимо двойственного воздействия на биологические структуры, в результате своего движения создает свободные объемы в пределах макромолекул. Это приводит к появлению поворотных или вращательных движений у ближайших, а затем и у последующих соседей в значительном объеме белковой глобулы.

Хотя такая вода является связанной, она, в отличие от основной цепи белка, способна на значительное перемещение в пределах объема макромолекулы при участии воды извне глобулы. От нее зависит движение боковых групп белковой макромолекулы и создание за счет этого свободных объемов в подповерхностных слоях. Подобный характер лабильности структуры белка необходим и для процессов диффузии лигандов в пределах белковых макромолекул, которые зависят от вязкости окружающей белок среды [243, 244]. Он находится в хорошем соответствии с моделью ограниченной диффузии в очень вязкой среде, основанной на данных γ -резонансной спектроскопии, согласно которой в белках происходят мелкомасштабные движения, характерные для жидкости, тогда как при увеличении их амплитуды возникают твердотельные ограничения [243].

Диффузионный характер внутреннего движения в белках и появление в пределах макромолекул свободных объемов, вмещающих молекулы воды, за счет корреляции флуктуаций движения отдельных молекулярных групп были непосредственно продемонстрированы методами численного моделирования молекулярной динамики белков [307, 326].

Но дело не ограничивается появлением внутреннего движения в глобулярных белках под воздействием воды. Наблюдаемые различия внутренней динамики между ферментами и неферментными белками, по существу, свидетельствуют о более жестких требованиях к равновесию сил в пределах макромолекул ферментов, осуществляющих химическое превращение субстрата, по сравнению с неферментными белками [12, 255]. Для организма весьма важно, чтобы не только субстрат или похожее на него соединение, но и продукты их биохимического превращения не были токсичными для него или же производились сверх необходимого. А это, естественно, должно ужесточить требования к избирательности реакций и возможности их регулирования. Равновесие сил и возможность быстрой перестройки структуры белка-фермента в ходе каталитической реакции должны влиять и на ее эффективность, причем существенную роль здесь может играть смещение равновесия за счет изменения структуры водного окружения в ходе реакции.

Отражением равновесия сил в пределах макромолекул ферментов являются также данные по регистрации процессов релаксации структуры белка в ходе биохимических реакций, имеющих различные вре-

менные характеристики и постепенно охватывающих все большую часть объема макромолекулы белка [73].

Принимая диффузионный характер перестройки структуры белковой макромолекулы в ходе ферментативной реакции, можно сопоставить времена корреляции для внутреннего движения с типичными временами ферментативных реакций. Известно, что время диффузии на расстояние x растет пропорционально квадрату этого расстояния. Исходя из приведенных выше данных о том, что времена корреляции для поворотных движений молекулярных групп на углы, превышающие 30° , составляют 10^{-8} – 10^{-9} с и принимая размер макромолекулы белка около 10 нм, имеем минимальное время диффузии 10^{-4} – 10^{-5} с. Это вполне сопоставимо с данными о наиболее коротких временах ферментативных реакций, тогда как в других случаях необходимо еще учитывать наличие барьера для реакции.

Таким образом, результаты исследований динамической структуры глобулярных белков в воде находятся в полном соответствии с представлениями о том, что необходимым условием высокой избирательности и эффективности биологических реакций, а также возможности управления ими является наличие в воде равновесия сил в пределах белковых макромолекул. Это определяет участие всей глобулы, а не только активного центра в биологических реакциях, с этим же связано и влияние на такие процессы окружающей водной среды, благодаря чему ферментативные реакции становятся чувствительными также к группам субстрата, не находящимся в непосредственном контакте с белком. На равновесии сил в пределах белковых глобул, по-видимому, основана и возможность изменения характеристик биологических реакций при воздействии на аллостерический центр белка и другие участки макромолекулы [148]. В организмах используются и другие способы регуляции биологических реакций за счет относительно слабых воздействий на макромолекулы белков, например за счет процессов сорбции–десорбции [13, 228]. Данный фактор, который, по-видимому, играет существенную роль в регуляции клеточных процессов, будет более подробно рассмотрен в соответствующей главе.

ГЛАВА 4

Влияние воды на динамические и некоторые функциональные характеристики биологических мембран

4.1. Введение

Приведенные выше данные подчеркивают ведущую роль воды в достижении равновесия сил в пределах белковых макромолекул, что создает условия для их функционирования и для регуляции биологических процессов. Наряду с белками весьма активную роль в клеточном метаболизме играют биологические мембраны, которые выполняют не только барьерную, но и большое число других функций и являются многокомпонентными системами, причем не все из этих компонентов имеют непосредственный контакт с водой. Роль воды в мембранах обычно рассматривают как организующий фактор, с помощью которого формируется пространственная бислойная структура мембран с включением в их состав интегральных белков и различных других компонентов [69, 123, 125]. В составе мембран образуются и более сложно построенные системы, необходимые для прохождения процессов фотосинтеза, биоэнергетических процессов и т. д. [131, 216, 178]. Определенное влияние на структуру мембран оказывают периферические белки и другие компоненты. Известно также, что при воздействии воды значительно, на несколько десятков градусов, снижается температура фазового перехода для липидной фазы. Это приводит к появлению динамической структуры липидного бислоя и к формированию в его пределах жидкой гидрофобной области из углеводородных цепей липидных молекул. В то же время известно, что удаление воды вызывает дестабилизацию бислоя, обычно с образованием для мембранных липидов гексагональной фазы [123, 125].

Вместе с тем, от мембран, как и от белков, требуется выполнение во многом несовместимых задач: с одной стороны, должна быть обеспечена

достаточно высокая прочность мембран, необходимая для сохранения их барьерных свойств. С другой стороны, в процессах функционирования мембранных структур важную роль играет их лабильность. От лабильности структуры зависит избирательная проницаемость мембран, возможность конформационных изменений белков в их составе, латеральная диффузия различных компонентов в мембранах и т. д. При этом если у белков многообразие их функций связано с большим разнообразием пространственных структур белковых макромолекул и их физико-химических свойств, то в случае мембран подобному многообразию функций соответствует весьма значительная вариабельность их состава, которая лишь по видам липидных молекул составляет сотни и даже тысячи [69].

Еще одной общей чертой мембран с белками является соответствие между динамическими характеристиками мембран и температурой среды обитания, для достижения которого ряд организмов способен изменять состав жирных кислот в липидах и соотношение разных липидных фракций в мембранах, в соответствии с повышением или понижением температуры окружающей среды. В то же время у такой важнейшей для организма макромолекулы, как ДНК, функционирование которой происходит с обязательным участием белков, теплостойкость слабо связана с температурой среды обитания [57].

Сопоставление всех этих данных позволяет предположить, что мембраны — хотя, вероятно, не любые — являются, как и белки, тонко уравновешенными системами и что вода участвует не только в организации пространственной структуры биологических мембран, но и активно воздействует на происходящие в них процессы.

Непосредственное подтверждение подобных представлений дают результаты исследований влияния гидратации на структурно-динамические и функциональные характеристики фотосинтетических мембран, а также различных модельных систем.

4.2. Влияние воды на структуру, динамику и функцию фотосинтетических мембран

Фотосинтетические мембраны (хроматофоры) пурпурных бактерий представляют особый интерес в качестве объекта для исследования эффектов гидратации. Прежде всего, они относятся к числу немногих систем, где обнаружена непосредственная связь между резким изменением структурно-динамических характеристик мембран в узком интервале значений относительной влажности (ОВ) и конкретной биологической функцией — переносом электрона между первичным и вторичным хинонными акцепторами интегрального белка реакционного центра (РЦ)

фотосинтеза [180, 181, 67, 24, 25, 46]. При этом основные характеристики данного перехода сохраняются и в более простой контролируемой системе РЦ–детергент [24]. Имеется также возможность для изучения влияния воды на структурно-функциональные показатели других участков цепи переноса электрона, которые резко отличаются друг от друга по своим кинетическим константам [131]. Это позволяет предположить, что их эффекты, в принципе, должны проявляться и в других областях влажности, причем изучение медленных стадий переноса электрона позволит получить сведения о влиянии воды на динамику и перестройку структуры в окружающем данную систему объеме. Определенным достоинством фотосинтетических мембран является и независимость ряда стадий переноса электрона от диффузионных ограничений, влияющих, например, на измеряемые эффекты взаимодействия субстрата с белком. Это делает возможным непосредственное сопоставление наблюдаемых изменений в динамике мембранных структур с их конкретной биологической функцией.

Дополнительная информация может быть получена также при изучении мембран, выделенных из разных видов пурпурных бактерий, которые имеют различный состав и заметно отличаются по своим эффектам гидратации. Подобная вариабельность делает возможным сопоставление и учет сложного характера эффектов воды, связанного с гидратацией полярных групп, наличием гидрофобных эффектов, с внедрением воды в водородные связи в белках и в полярные участки липидной фазы мембран, с различием диэлектрических свойств связанной и свободной воды, а также с эффектами рН, ионной силы и т. д. Для выделения каждого из таких эффектов и их возможной роли в изучаемых процессах необходимо иметь соответствующее число независимых параметров, что, в свою очередь, требует использования комплекса методов для изучения разных видов мембран и модельных систем в зависимости от влажности. Все это в целом позволило использовать фотосинтетические мембраны в качестве удобного объекта для изучения влияния воды на структурно-динамические и функциональные характеристики биологических мембран и выявления при этом возможных общих закономерностей роли воды в мембранных структурах.

Были изучены фотосинтетические мембраны, выделенные из трех видов пурпурных бактерий: *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sphaeroides* и *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* [24, 25, 38, 46, 261, 264]. Мембраны этих видов заметно отличаются друг от друга по своему составу, а также по ряду структурно-динамических и функциональных характеристик в зависимости от уровня влажности. В частности, мембраны *E. shaposhnikovii*, в отличие от мембран двух других видов бактерий, сохраняют при выделении, помимо интегрального белка РЦ, также ци-

тохромы *C*, которые достаточно прочно ассоциированы с пигмент-белковым комплексом РЦ в мембране. Это позволяет изучать взаимодействие липидного компонента мембран и воды не только с интегральным белком РЦ, но и с периферическим белком — цитохромом *C*.

Использование метода ЯМР для протонов и для ядер ^{13}C и ^{31}P позволило получить не только обобщенные данные о динамике мембран в целом, но и сведения о динамике белкового компонента, а также полярной и неполярной областей липидной фазы мембран в отдельности в зависимости от уровня влажности. Эти результаты были сопоставлены с функциональными характеристиками реакций переноса электрона на различных участках цепи фотосинтеза для указанных видов мембран, а также с другими показателями [264, 38, 46]. При этом сопоставление данных различных методов в таких исследованиях, а также данных для модельных систем позволило значительно увеличить достоверность интерпретации полученных результатов.

4.2.1. Особенности гидратации фотосинтетических мембран

Кривые гидратации фотосинтетических мембран изученных видов пурпурных бактерий, как можно видеть на рис. 18, существенно отличаются как друг от друга, так и от обычных кривых гидратации глобулярных белков, в данном случае сывороточного альбумина (СА). Наиболее отчетливо такие различия выражены для мембран бактерий *R. rubrum*. Кривые гидратации данных мембран выделяются резким приростом адсорбции воды в интервале значений $P/P_0 = 0,3 \div 0,5$, тогда как дальнейшее повышение относительной влажности (ОВ) вплоть до 0,8 практически не приводит к росту ее содержания (рис. 18а). Одновременно в том же интервале ОВ резко увеличивается количество подвижных водородсодержащих молекул и возрастает их подвижность, что следует из многократного прироста амплитуды быстрого компонента от подвижных молекул с $T_2 = 0,1 - 0,4$ мс и появления медленного компонента спада спинного эха для протонов от более подвижных молекул с $T_2 = 2,5 - 3,2$ мс (рис. 19в). При этом общее количество подвижных молекул (в пересчете числа протонов на воду) заметно превышает содержание воды в данных мембранах (рис. 19б и в), что позволяет отнести по крайней мере часть наблюдаемого сигнала ЯМР к молекулам липидов и их хвостовым группам. Основная же часть сигнала ЯМР относится к резкому приросту адсорбции воды полярными группами липидной фазы мембран *R. rubrum*. Особенностью этих мембран является преобладание в липидной фазе (около 65% [346]) фосфатидилэтаноламина (ФЭ), между молекулами которого могут образовываться водородные связи. Как отмечено выше (см. гл. 2), молекулы воды способны внедряться

в такие связи, что, по-видимому, и обеспечивает наблюдаемый прирост адсорбции воды. Аналогичный результат был получен для пигмент-белковых комплексов реакционных центров (РЦ), выделенных из мембран с помощью детергента лаурилдиметиламинооксида (ЛДАО), также образующего водородные связи между своими молекулами. Там изменения в адсорбции воды и по приросту подвижности выражены еще более резко. В случае же замены ЛДАО на другой детергент — Тритон X-100, область перехода становится значительно шире [24].

Связь другой части подвижных молекул и групп с неводными компонентами подтверждают данные ЯМР для протонов при увлажнении образцов в парах тяжелой воды, а также данные ЯМР на ядрах углерода ^{13}C , что будет рассмотрено далее.

Кривые гидратации для мембран *Rb. sphaeroides* с более низким содержанием ФЭ по сравнению с *R. rubrum* [360] имеют и более плавный характер (рис. 18 а), тогда как в мембранах *E. shaposhnikovii* основной прирост содержания воды отмечен при ОВ $0,5 \div 0,7$ и выше (рис. 18 б). Для них наблюдается также большая эффективность в поглощении D_2O по сравнению с H_2O при низких значениях влажности, которая постепенно уменьшается при дальнейшем росте ОВ. Это показывает, что общее количество центров сорбции в обоих случаях одинаково, но их доступность для обычной и тяжелой воды при низкой влажности заметно отличается, что, по-видимому, обусловлено большей энергией связи молекул воды в случае D_2O [264].

Таким образом, полученные данные указывают на связь резкого прироста в поглощении воды в интервале $P/P_0 = 0,3 \div 0,5$ с ее внедрением в водородные связи между полярными головками молекул ФЭ в мембранах *R. rubrum* или детергента ЛДАО. Подобный эффект в случае преобладания таких молекул в липидной фазе имеет характер фазового перехода, что находится в соответствии также с данными исследований на модельной системе ЛПЭИ–вода [44, 265]. Процесс внедрения молекул воды, по-видимому, имеет место и в белках, что, в частности, приводит к резкому изменению в том же самом интервале ОВ эффективности фотоокисления цитохрома *C* в мембранах *E. shaposhnikovii* (см. рис. 20 а). Но количество такой воды существенно меньше, чем в липидной фазе, что следует также из отсутствия заметного прироста гидратации для указанных мембран в данном интервале ОВ (рис. 18 б).

На наличие еще одной особенности кривых гидратации, заметно влияющей на характеристики биосистем вблизи $P/P_0 = 0,6$, указывает сопоставление данных для бычьего сывороточного альбумина (БСА) и системы БСА–лиганды (рис. 19 в) [23]. Здесь, несмотря на увеличение общего числа полярных групп в системе БСА–лиганды, количество поглощенной воды при ОВ ниже 0,6 явно меньше, чем в чистом БСА. В то

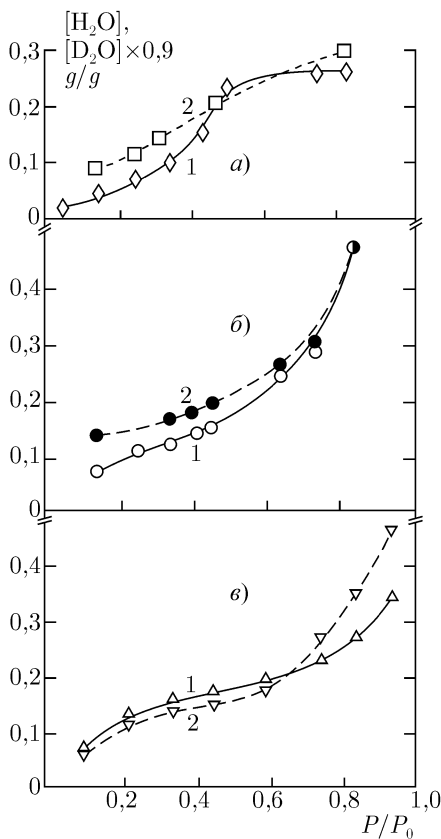


Рис. 18. а) Кривые гидратации для мембран бактерий *R. rubrum* ($\diamond$) [24] и *Rb. sphaeroides* ($\square$) (г H_2O на г сухого веса мембран), P/P_0 — относительная влажность; б) то же для мембран *E. shaposhnikovii*, увлажненных в парах H_2O ($\circ$) и D_2O ($\bullet$) [25]. Значения веса для D_2O умножены на 0,9 (отношение масс H_2O и D_2O); в) кривые гидратации для белка бычьего сывороточного альбумина (Δ) и БСА с добавлением на 1 М белка примерно 1 М низкомолекулярных лигандов (∇) (средний молекулярный вес около 2 кДа), выделенных из крови [23, 264]

же время при ОВ больше 0,6 кривые гидратации для данных объектов пересекаются между собой, причем дальнейший рост ОВ вызывает более значительный прирост количества поглощенной воды в системе БСА–лиганды по сравнению с БСА. Подобные изменения, как отмечалось ранее

(см. главу 2), по-видимому, обусловлены появлением при $P/P_0 > 0,6$ свободной воды с высоким значением диэлектрической постоянной, что ослабляет связи между противоположно заряженными группами белка и лиганда и делает их доступными для гидратации [23].

Таким образом, помимо начального участка кривых гидратации, определяемого взаимодействием воды с доступными для нее полярными группами в мембранах, можно выделить еще две области, в которых существенно изменяется характер воздействия воды на изучаемые биологические структуры. Одна из них обусловлена внедрением молекул воды в водородные связи внутри белков и между образующими такие связи молекулами липидов при $P/P_0 = 0,3 \div 0,5$, тогда как другая область связана с появлением свободной воды с высоким значением диэлектрической постоянной при ОВ более 0,6. И в каждой из этих областей, как будет рассмотрено далее, отмечены изменения определенных динамических и функциональных характеристик фотосинтетических мембран.

4.2.2. Особенности влияния гидратации на динамику и функцию фотосинтетических мембран

Отмеченные выше различия кривых гидратации для фотосинтетических мембран, выделенных из пурпурных бактерий разных видов, обусловлены различием их состава и структуры, что находит отражение также в значительном отличии динамических и функциональных характеристик этих мембран в зависимости от влажности. В мембранах бактерий *R. rubrum* можно видеть отчетливую связь между резким ростом поглощения воды в интервале $P/P_0 = 0,3 \div 0,5$ и еще более острыми изменениями числа подвижных молекул (рис. 19 в), сопровождаемого весьма резким увеличением эффективности N фотоиндуцированного переноса электрона от первичного к вторичному хинонному акцептору (рис. 19 а) [24, 46, 264]. Там же приведены данные еще об одном процессе, который относится к изменению времени рекомбинации между фотоактивным пигментом P^+ и первичным акцептором Q_A в препаратах РЦ, выделенных из тех же мембран с помощью детергентов ЛДАО и Тритона X-100 [24]. Такие изменения не зависят от вида детергента, и они наблюдаются на самом начальном этапе гидратации, т. е. в области, где вода взаимодействует практически лишь с заряженными группами.

Совершенно другая картина отмечается в мембранах *E. shaposhnikovii*. Здесь подвижность значительной части неводных молекул, регистрируемая по измерениям T_1 и T_2 для протонов (рис. 20 б и в), в том числе при увлажнении в парах тяжелой воды, остается доста-

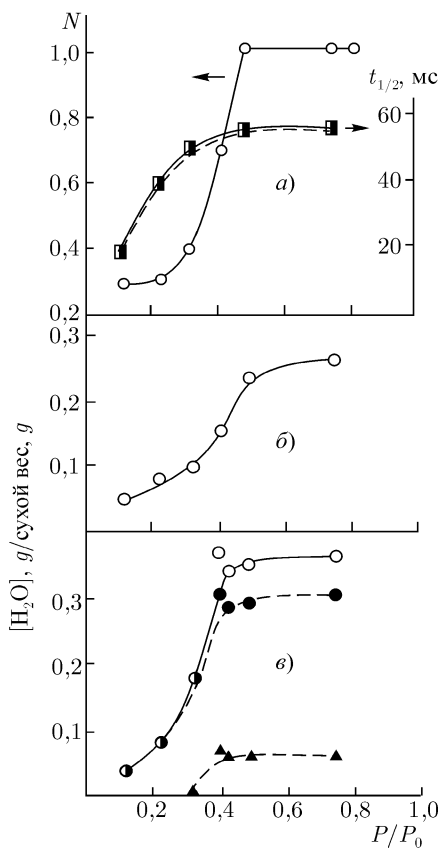


Рис. 19. а) Эффективность (N) фотоиндуцированного электронного транспорта от первичного (Q_A) к вторичному (Q_B) хинонному акцептору в мембранах *R. rubrum* (○) и время $t_{1/2}$ рекомбинации между фотоактивным пигментом P^+ и первичным акцептором Q_A в препаратах РЦ, изолированных из мембран *R. rubrum* детергентами ЛДАО (— □ —) или Тритоном X-100 (— ● —); б) кривые гидратации для мембран *R. rubrum*; в) суммарная амплитуда сигнала спинового эха ЯМР для подвижных протонов в мембранах *R. rubrum* (○) (в пересчете на вес воды) и его компоненты: быстрый ($T_2 = 0,1 \div 0,4 \text{ мс}$) (●) и медленный ($T_2 = 2,5 \div 3,2 \text{ мс}$) (▲) [24, 264]

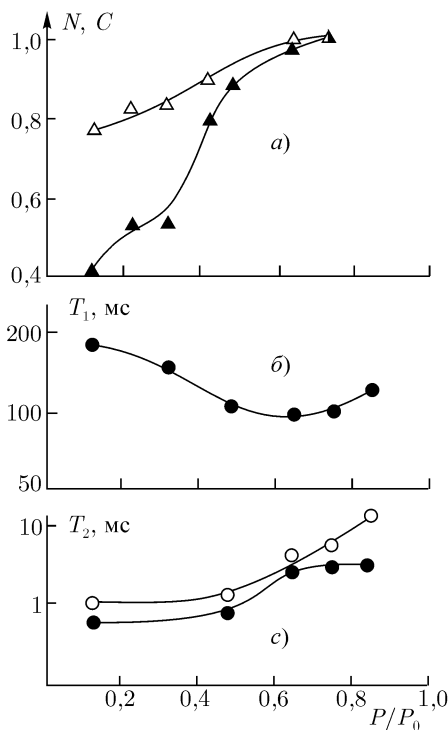


Рис. 20. а) эффективность (N) фотоиндуцированного электронного транспорта от первичного (Q_A) к вторичному (Q_B) хинонному акцептору (D) и эффективность (C) фотоиндуцированного окисления цитохрома C ($\blacktriangle$) в мембранах *E. shaposhnikovii* при различной относительной влажности P/P_0 [191]; б) значения T_1 для протонов в этих мембранах при их увлажнении в парах D_2O ; в) значения T_2 для протонов в этих мембранах при увлажнении в парах H_2O ($\circ$) и D_2O ($\bullet$) [25]

точно высокой и при низких значениях ОВ. Сохраняется на высоком уровне также эффективность N фотоиндуцированного электронного транспорта от первичного (Q_A) к вторичному (Q_B) хинонному акцептору (рис. 20 а). При этом повышение влажности приводит лишь к постепенному возрастанию как подвижности, так и эффективности N электронного транспорта между хинонными акцепторами. Интервал относительной влажности $P/P_0 = 0,3 \div 0,5$ особо не выделяет-

ся и по своему воздействию на динамические характеристики мембран *E. shaposhnikovii* в целом (рис. 20 б и в). Но в этом интервале отмечается резкое возрастание эффективности фотоокисления цитохрома *C* [191] (рис. 20 а) — процесс, который явно не связан с диффузионными ограничениями в пределах мембран и, по-видимому, обусловлен изменением структуры самого белка именно в той области, где молекулы воды способны включаться в водородные связи внутри биологических структур, в данном случае внутри белка цитохрома *C*. В той же области ОВ отмечалось изменение конформации мембранного белка РЦ и увеличение его конформационной подвижности, что было зарегистрировано методами γ -резонансной спектроскопии [67], методом спиновых меток [158], а также ЯМР-спектроскопии высокого разрешения [38, 261]. На резкое изменение свойств белков в данном интервале ОВ указывает также отмеченное ранее значительное увеличение скорости гидролиза циннамоил- α -химотрипсина в твердой фазе [236, 237].

Вместе с тем, вблизи $P/P_0 = 0,6$, т.е. в области, связанной с появлением воды с высокой диэлектрической постоянной, наблюдается отчетливо выраженный прирост значений T_2 для протонов неводных молекул или их отдельных групп (рис. 20 в), указывающий на повышение их подвижности. И примерно в этом же интервале ($P/P_0 = 0,5 \div 0,88$ [238, 286]) заметно изменяется эффективность переноса электрона от цитохрома *C* к бактериохлорофиллу реакционного центра. Дальнейший рост ОВ сравнительно слабо влияет на данный тип движения в неводных молекулах и воздействует практически лишь на подвижность водного компонента (рис. 20 в).

Дополнительная информация о природе наблюдаемых изменений динамики фотосинтетических мембран и их возможном отнесении к тем или иным структурам была получена при исследовании спектров ЯМР на ядрах углерода ^{13}C и фосфора ^{31}P .

Спектры ЯМР высокого разрешения от ядер углерода-13 на частоте 75 МГц в мембранах *R. rubrum* и *Rb. sphaeroides* в твердой фазе были зарегистрированы при вращении образцов под магическим углом [38]. Они содержат 2 достаточно хорошо разрешенные линии (рис. 21). Сопоставление молекулярного состава компонентов мембран показывает, что левая линия относится главным образом к молекулярным группам белков, а правая в основном к группам, принадлежащим неполярным участкам липидов [38]. При этом сами полученные спектры, как видно из данных, приведенных на рис. 21, слабо зависят от влажности образцов мембран.

Более чувствительными к изменению ОВ оказались времена релаксации T_1 от ядер ^{13}C для этих линий (рис. 22). В связи с возмож-

ным вкладом минорных составляющих в линии, отнесенные к белкам и к неполярным участкам липидов, соответственно, были сделаны оценки возможного их влияния на наблюдаемые зависимости T_1 от влажности. Было показано, на основе сопоставления данных ЯМР по динамике белков в твердой фазе [267, 268], что учет частичного вклада от белковых групп может лишь ослабить, а не усилить наблюдаемые изменения T_1 для липидных групп с ростом влажности. То же относится и к вкладу липидной составляющей в зависимость T_1 для белков от влажности [38].

Как следует из рис. 22, значения T_1 для неполярных участков липидов в мембранах *R. rubrum* сначала уменьшаются с ростом влажности, затем достигают минимума около $P/P_0 = 0,3$ и при дальнейшем увеличении влажности начинают расти. Наличие такого минимума T_1 [5, 110] является прямым указанием на близость частот движения неполярных участков липидов к частоте резонанса (в данном случае 75 МГц) Этот тип движения, по-видимому, связан с вращением хвостов липидных молекул. Минимум T_1 также наблюдался для протонов неводных молекул в мембранах *E. shaposhnikovii* в случае, когда они были увлажнены в парах тяжелой воды (рис. 20 б) [238]. Но здесь он смещен в сторону более высокой влажности, что, по-видимому, связано с отличием структуры этих мембран от мембран *R. rubrum*, а также с наличием вклада в общую величину T_1 как от липидов, так и от других компонентов.

Дальнейшее увлажнение мембран *R. rubrum* приводит к появлению еще одного типа движения в липидах, на что указывает резкое падение значений T_1 для ядер ^{13}C при увеличении ОВ до 0,8 (рис. 22). Подобный эффект был отнесен к появлению вращательного движения молекул липидов как целых [264].

Для белкового компонента мембран *R. rubrum* рост ОВ на начальных стадиях увлажнения оказывает более слабое влияние на величину T_1 от ядер ^{13}C . Здесь наблюдается постепенное падение T_1 вплоть до

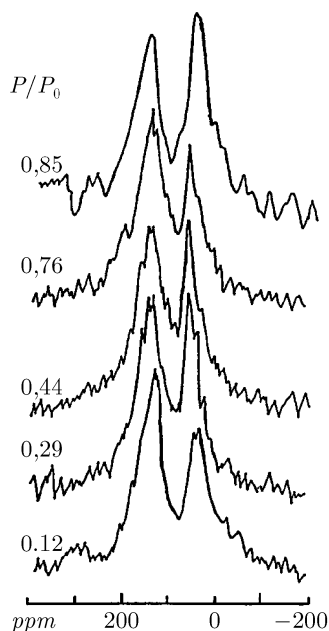


Рис. 21. Спектры ЯМР для ядер углерода ^{13}C на частоте 75,476 МГц от мембран бактерий *R. rubrum*, находившихся при различной относительной влажности P/P_0 [39]

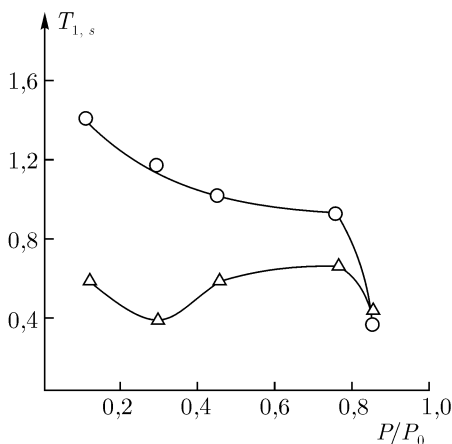


Рис. 22. Значения T_1 для ядер углерода ^{13}C от белкового (○) и липидного (Δ) компонентов мембран *R. rubrum* в зависимости от относительной влажности [38]

значений $P/P_0 = 0,5$, что свидетельствует о некоторой активации внутреннего движения в белках. Но затем, как и в липидах, за относительно медленными изменениями времен релаксации при достижении значений ОВ около 0,8 наблюдается резкое падение величины T_1 . Это может быть связано с дополнительной резкой активацией внутреннего движения в белках, а также, возможно, с появлением вклада от движения белковой глобулы как целого.

Полученные выше данные относились к белкам и неполярным участкам молекул липидов. Для выявления общей картины внутренних движений в мембранах в зависимости от ОВ и их отличий у различных видов бактерий были изучены также особенности структуры и подвижности в полярной части мембран *Rb. sphaeroides* и *R. rubrum* с помощью спектроскопии ЯМР на ядрах ^{31}P [264].

Исследование зависимости T_1 для ядер фосфора-31 от ОВ выявило прямо противоположный характер изменения подвижности полярных участков липидов в мембранах бактерий *R. rubrum* и *Rb. sphaeroides* (рис. 23 а и б). Если в *Rb. sphaeroides* рост ОВ приводит к постепенному падению значений T_1 , что указывает на увеличение подвижности полярных участков липидной фазы в ходе увлажнения, то в мембранах *R. rubrum* рост ОВ приводит к неожиданному результату — ужесточению структуры полярной области. Данный процесс более активно проходит на тех этапах увлажнения, где, согласно результатам измерений T_1 для

ядер углерода ^{13}C (рис. 22), отмечен значительный прирост подвижности неполярных хвостов липидов. Подобные различия в поведении разных участков мембран и между мембранами изученных видов бактерий в зависимости от влажности отмечены на начальных и промежуточных этапах увлажнения. И лишь при достижении значений ОВ около 0,8 во всех указанных случаях наблюдается увеличение подвижности различных компонентов мембран с ростом влажности. Данный вывод следует из заметного падения значений T_1 для ядер углерода ^{13}C от липидного и белкового компонентов и для ядер фосфора ^{31}P от полярных участков липидов, от которых зарегистрирована также узкая линия резонанса с T_2 порядка сотен мкс (рис. 22 и 23).

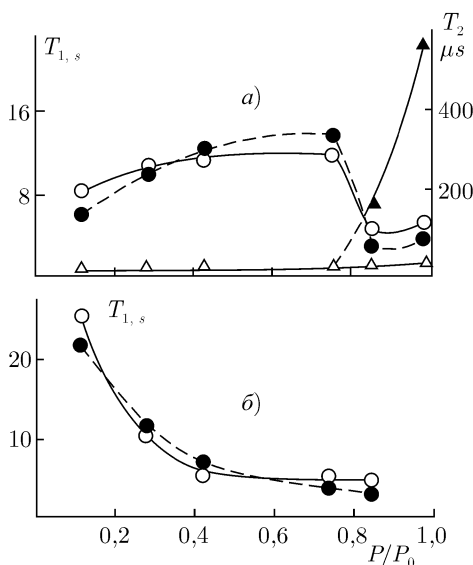


Рис. 23. а) значения T_1 для ядер фосфора ^{31}P для амплитудных (○) и интегральных (●) величин медленных компонентов восстановления продольной намагниченности и значения T_2 для узкой и широкой линий спектра ЯМР от этих ядер в мембранах *R. rubrum* при различной относительной влажности [46, 264]; б) то же для мембран *Rb. sphaeroides*

Отмеченные выше различия характеристик мембран *R. rubrum* и *Rb. sphaeroides* в зависимости от ОВ, как показали исследования формы спектров ЯМР от ядер ^{31}P , связаны с различным исходным состоя-

нием липидной фазы этих мембран при низкой ОВ (рис. 24). Наблюдаемая асимметрия спектра ЯМР от ^{31}P (рис. 24 а) является реальным доводом в пользу существования гексагональной фазы [292, 361] для липидов в сухих образцах мембран *Rb. sphaeroides*. Наличие гексагональной фазы за счет взаимодействия полярных участков липидов между собой объясняет их сравнительно жесткую структуру для мембран *Rb. sphaeroides* в сухом состоянии. То же наличие гексагональной фазы может объяснить и сохранение сравнительно высокой подвижности для липидных хвостов в сухом состоянии в мембранах *E. shaposhnikovii* и, соответственно, сохранение высокой эффективности N передачи электрона от первичного к вторичному хинонному акцептору (рис. 20 а).

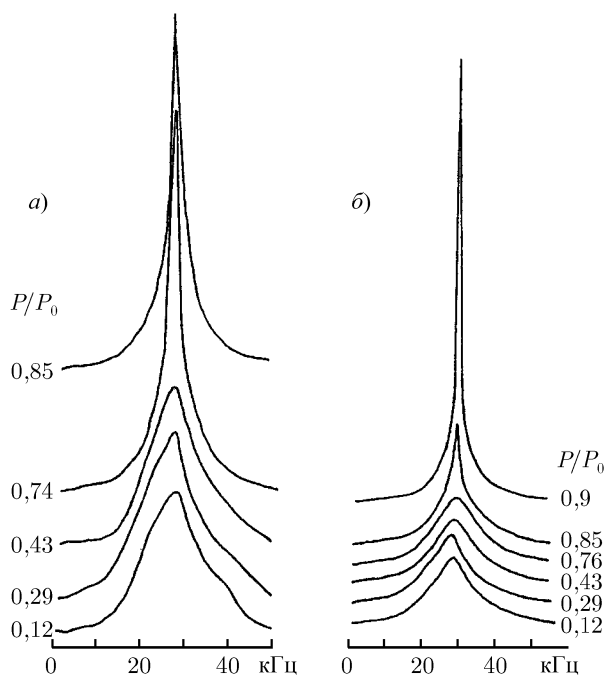


Рис. 24. Спектры ЯМР для ядер ^{31}P на частоте 121 МГц в мембранах бактерий *Rb. sphaeroides* (а) и *R. rubrum* (б) при различной относительной влажности [264]

С ростом ОВ асимметрия спектра ЯМР от ^{31}P в мембранах *Rb. sphaeroides* становится менее выраженной, что, наряду с падением значений T_1 для этих ядер, указывает на постепенное уменьшение доли гексагональной фазы с одновременным ростом подвижности в полярной области мембран.

В мембранах *R. rubrum* в сухом состоянии, где подобная асимметрия не наблюдается, имеет место иная картина. Отсутствие подобной асимметрии спектра, а также наличие плотной упаковки липидных хвостов свидетельствуют о сохранении в них бислойной или близкой к ней фазы. Внедрение молекул воды в полярную область этих мембран в области $P/P_0 = 0,3 \div 0,5$, с одной стороны, вызывает дополнительное упрочнение связей между полярными головками липидных молекул, в данном случае ФЭ, а с другой — приводит к увеличению объема полярной области мембран. Соответственно, подобное увеличение объема должно приводить к разрыхлению упаковки неполярной области мембран и к росту подвижности липидных хвостов. Данный вывод полностью согласуется с результатами ЯМР измерений для протонов в мембранах *R. rubrum* (рис. 19в).

Таким образом, изучение структурно-динамических характеристик полярной и неполярной областей липидной фазы, а также белков в составе различных видов фотосинтетических мембран и их сопоставление с функциональными показателями и данными для модельных систем при разной относительной влажности позволило выявить ряд общих закономерностей воздействия воды на мембранные структуры.

Первый этап гидратации влияет лишь на часть полярных групп, что прямо следует из данных для модельной системы СА-лиганды, где уровень гидратации заметно ниже, чем в отдельном белке. Этот эффект активно проявляется и в случае исходной гексагональной и близкой к бислойной структуры липидной фазы. Но уже на данном этапе возникают локальные изменения в мембранах и отмечается некоторое падение значений T_1 для ядер ^{13}C , что приводит к функциональным изменениям — росту времени рекомбинации фотоактивного пигмента и первичного акцептора (рис. 19а).

Следующий этап гидратации определяется эффектами внедрения молекул воды в водородные связи внутри белковой и липидной фазы мембран, что особенно явно выражено для мембран *R. rubrum*, где среди липидов преобладает ФЭ, образующий такие связи (рис. 19б). С этапом включения молекул воды в состав белка связано и резкое увеличение эффективности фотоокисления цитохрома *C* в мембранах *E. shaposhnikovii* (рис. 20а), а также изменение динамики белка РЦ [238, 286]. Резкий характер перехода связан с тем, что он требует участия некоторого минимального числа молекул воды, так как

их включение в эти связи сопряжено с необходимостью разрыва также соседних прямых связей (см. гл. 2). Более сильные водородные связи у тяжелой воды объясняют изотопный эффект ее включения в состав мембран *E. shaposhnikovii* при низких значениях ОВ (рис. 18б). В случае же мембран *R. rubrum* внедрение молекул воды упрочняет связи в полярной области и увеличивает ее объем, вызывая разрыхление упаковки липидных хвостов и резкий рост их динамики. В свою очередь, динамика влияет на эффективность передачи электрона между хинонными акцепторами, уменьшая вероятность обратной реакции за счет изменения расстояния между структурами. Для ее уменьшения до 1% и менее характеристические времена движения должны быть, по крайней мере, на 2 порядка короче времени жизни электрона в полученном состоянии. Последнее порядка микросекунд [131], тогда как времена движения, согласно наличию минимума T_1 для ядер углерода ^{13}C от неполярной фазы липидов (рис. 21), относятся к наносекундному диапазону, что находится в полном согласии с указанным предположением.

Близкая зависимость от ОВ для переноса заряда между хинонными акцепторами и для фотоокисления цитохрома *C* (рис. 19а и 20а), наряду с дополнительным падением T_1 для углерода ^{13}C от белка, позволяет предположить, что и свойства цитохрома *C* изменяются за счет внедрения молекул воды в водородные связи внутри белка, хотя это менее заметно на кривой гидратации из-за малой доли таких молекул. Такой же эффект, по-видимому, имеет место и для белка РЦ. Как уже отмечалось в главе 3, в той же области ОВ становятся возможными ферментативные реакции в твердой фазе [236] и здесь же резко снижается тепловая устойчивость ДНК (рис. 7) [179]. Во всех этих структурах важную роль играют водородные связи.

Основные черты третьего этапа гидратации мембранных структур определяются появлением при ОВ $> 0,6$ свободной воды, имеющей высокую диэлектрическую постоянную. В результате ослабляется взаимодействие между разноименными зарядами и становится возможной их гидратация, что отчетливо следует из сравнения данных для СА и системы СА–лиганды (рис. 18в). Близость кривых гидратации для такой системы и для мембран *E. shaposhnikovii* в данном диапазоне ОВ показывает, что и в случае этих мембран, по-видимому, резко растет число доступных для воды полярных групп. Ослабление зарядовых взаимодействий в присутствии воды, в свою очередь, приводит к появлению латеральной диффузии в пределах мембран, что следует из сужения резонанса для ядер ^{31}P , а также из роста значений T_2 для протонов неводного компонента в мембранах *E. shaposhnikovii*. А это делает возможным регуляцию процессов фотосинтеза с помощью по-

движных переносчиков [207, 341], в том числе и за счет изменения расстояния между макромолекулами белков, например, между цитохромом *C* и белком РЦ. Последнее проявляется при высокой ОВ в мембранах *E. shaposhnikovii* через изменение эффективности переноса электрона между этими белками. Данные для модельной системы цитохром *C*–феррицианид Fe показывают, что увеличение расстояния между атомами Fe от 1 до 1,5 нм полностью блокирует перенос электрона [287]. Такой процесс способен предотвратить нарушение структуры мембран в случае, когда поток электронов не может быть использован в последующих реакциях.

В других изученных видах фотосинтезирующих бактерий цитохромы *C* слабо связаны с мембраной, и они могут быть отделены от нее, например, при повышении ионной силы, изменении pH [354, 355] или напряжения на мембранах [143] и т. д. Высокая чувствительность таких процессов, которые могут быть использованы для регуляции процессов фотосинтеза при нормальной оводненности или вблизи нее определяется тем, что переходы периферических белков в воду связаны с малым изменением свободной энергии. Обоснование возможности подобного процесса будет рассмотрено отдельно в следующей главе.

Все приведенные выше данные показывают, что процесс гидратации биологических мембран не сводится лишь к последовательности заполнения тех или иных участков поверхности белков и липидной фазы мембран, а связан с глубокими изменениями их структурно-динамических и функциональных характеристик. Подобные изменения носят или локальный (на первом этапе), или более общий характер (в последующем), и от них зависит эффективность переноса электрона на 4-х участках цепи фотосинтеза. Глубокие изменения структуры мембран происходят не только при взаимодействии воды с полярными группами данных структур или за счет гидрофобных эффектов. Значительные изменения структуры мембран, имеющие в ряде случаев нелинейную зависимость от влажности, происходят при внедрении воды в водородные связи внутри белков и между образующими такие связи молекулами липидов, а также при появлении свободной воды с высоким значением диэлектрической постоянной. Относительно резкий характер наблюдаемых при этом переходов от ОВ при слабой зависимости в других интервалах может иметь определенное биологическое значение в том числе для сохранения устойчивости таких структур при малой влажности. Как уже упоминалось выше, резкое изменение устойчивости при $ОВ > 0,3$ наблюдали для ДНК [179]. В то же время нелинейная зависимость от ОВ для латеральной диффузии, обусловленная появлением свободной воды, должна влиять и на изменение проницаемости мембран. Это может быть существенным для защиты содержимого клеток от внешних

воздействий до тех пор, пока при появлении свободной воды не будут запущены метаболические и репарационные процессы. Данные вопросы будут рассмотрены отдельно в последующих разделах.

4.3. Сложный характер динамики биологически активных веществ в мембранах

Важная роль малых разностных эффектов, связанных с воздействием воды на мембранные процессы, проявляется также в сложном характере поведения ряда биологически активных веществ (БАВ) в пределах мембран. Имеется довольно обширная литература, в которой на основе изучения подвижности таких веществ в мембранах методами флуоресцентных [91] или спиновых зондов [157] или ЯМР [110, 15] определяли их местоположение в пределах относительно твердой гидрофильной или жидкой гидрофобной областей мембран. С этим местоположением обычно связывали характер воздействия подобных соединений. Вместе с тем известно, что действие многих веществ часто сопровождается широким спектром действия и различными побочными эффектами, для учета которых приходится испытывать многие десятки и сотни веществ с близкими структурными характеристиками, но, тем не менее, заметно отличающихся по своему воздействию на организм. Одной из причин наблюдаемых отличий может быть сложный характер поведения таких веществ в мембранах, который не сводится лишь к эффектам одного-единственного местоположения. Отсюда следует, что измерение только отдельных характеристик БАВ в мембранах явно недостаточно для выявления их сложного поведения. Здесь, как и в других рассмотренных случаях, необходима регистрация и учет нескольких не связанных между собой независимых показателей.

Для решения этой задачи было выполнено исследование молекулярной подвижности ряда БАВ в составе искусственных фосфолипидных мембран методом протонного резонанса с использованием парамагнитных ионов Mn^{++} [29, 79]. Выбор веществ, содержащих ароматические группировки, линии протонного резонанса для которых смещены от линий фосфолипидов, позволил одновременно регистрировать не только характеристики подвижности таких соединений в пределах везикул и уширяющее воздействие парамагнитных ионов на их линии, но и возможность влияния некоторых из этих веществ на проницаемость везикул для ионов Mn^{++} , что определяли по уширению линий протонного резонанса от *N*-метильных групп внутреннего слоя везикул. Оценивали также возможность обмена этих соединений между везикулами через водную среду.

Местоположение ароматических соединений в везикулах определяли по полуширине протонного резонанса от таких соединений при их мольном соотношении к фосфолипидам 1 : 10 или 1 : 20. При этом исходили из заметных различий микровязкости для гидрофильных (жестких) и гидрофобных (подвижных) участков везикул. Фосфолипиды представляли смесь фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в соотношении 2 : 1 при незначительном содержании в смеси лизофосфатидилхолина. Условия эксперимента приведены в работе [29].

Согласно полученным данным, полуширина протонного резонанса для изученных соединений в составе везикул составляет для окисленного витамина K_3 9 Гц, диурона — 5 Гц, динитрофенола (ДНФ) — 6 Гц, дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) в окисленной и восстановленной формах — 5 Гц, фенантролина — 7 Гц. (Один из спектров протонного резонанса показан на рис. 25.) Близкая к этим значениям величина полуширины, с учетом дополнительного расщепления резонанса за счет косвенного спин-спинового взаимодействия между соседними протонами [110], была получена для 2-этилбензимидазола (ЭБИ). Полученные значения, принимая во внимание различия молекулярных масс, показывают, что эти соединения находятся примерно в одинаковом микроокружении, причем их подвижность сопоставима с подвижностью введенного в состав таких везикул бензола, полуширина протонного резонанса для которого равна 3 Гц. Подвижность таких соединений сопоставима также с подвижностью метиленовых групп самих фосфолипидов, что следует из непосредственного сравнения полуширины для их линий (20 Гц) с данными для метиленовых групп (с учетом более близкого расстояния между протонами в этих группах ($\tau = 1,78 \text{ \AA}$) по сравнению с ароматическими группами ($\tau = 2,5 \text{ \AA}$)). Подобные результаты свидетельствуют о расположении изученных веществ в жидкой гидрофобной области фосфолипидных искусственных мембран.

Вместе с тем было обнаружено, что влияние парамагнитных ионов Mn^{2+} на характеристики резонанса от разных ароматических соединений имеет заметные отличия. Сами фосфолипидные везикулы непроницаемы для этих ионов, и ионы марганца, из-за относительно большого расстояния от веществ, находящихся в гидрофобной области мембран, не должны влиять на ширину резонанса от них (зависимость $1/\tau^6$ [110]). Но подобный результат был зарегистрирован только для бензола. Для диурона и восстановленного витамина K_3 линии протонного резонанса заметно уширялись (рис. 26), причем везикулы оставались непроницаемыми для ионов марганца. В то же время для остальных перечисленных выше соединений резонансные линии не только заметно уширялись, но и везикулы становились проницаемыми для парамагнитных ионов марганца [29].

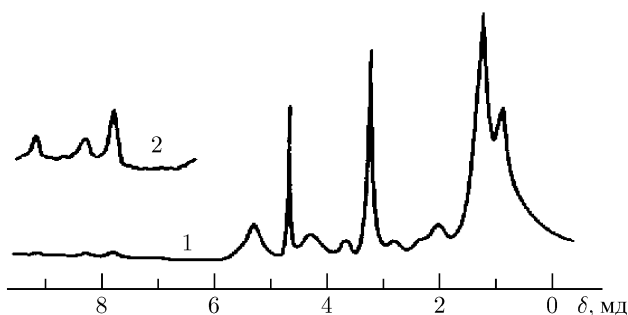


Рис. 25. Спектр протонного резонанса на 80 МГц от фосфолипидных везикул в D_2O , в состав которых включен фенантролин при мольном соотношении 1:10 к фосфолипидам. 1 — общий вид спектра; 2 — ароматическая область спектра при 10-кратном усилении [29]

Сопоставление этих результатов с данными, полученными при изучении подвижности таких соединений в фосфолипидных мембранах, показывает, что такие вещества, как ДНФ, ЭБИ, ДХФИФ, фенантролин и восстановленный витамин K_3 , в отличие от бензола, находятся в гидрофобной области мембран не постоянно, а основную часть времени. Подобные различия трудно установить по одной лишь ширине резонанса. Вместе с тем, данные вещества под действием флуктуаций энергии теплового возбуждения часть времени проводят вблизи фосфатных групп липидов, где связаны ионы марганца, и некоторые из таких соединений, возможно, вступают в контакт с этими ионами. Возможность выхода таких соединений не только в полярную часть везикул, но и в водную среду подтверждают данные наших экспериментов с использованием смеси везикул, содержащих и исходно не содержавших БАВ. Обмен БАВ между таким везикулами оценивали по кинетике уширения и исчезновения линий от N -метильных групп внутреннего слоя везикул, ранее не содержавших БАВ. Амплитуда этих линий убывала со временем по экспоненте с характеристическими временами 0,85 ч и 6,5 ч в случае ДНФ и окисленного витамина K_3 , соответственно. Более высокая скорость обмена ДНФ по сравнению с витамином K_3 коррелирует с более высокой растворимостью ДНФ в воде.

Таким образом, изученные биологически активные вещества обнаруживают сложный характер своего поведения в мембранах. Из-за гидрофобности этих веществ для них не существует гидрофобного барьера,

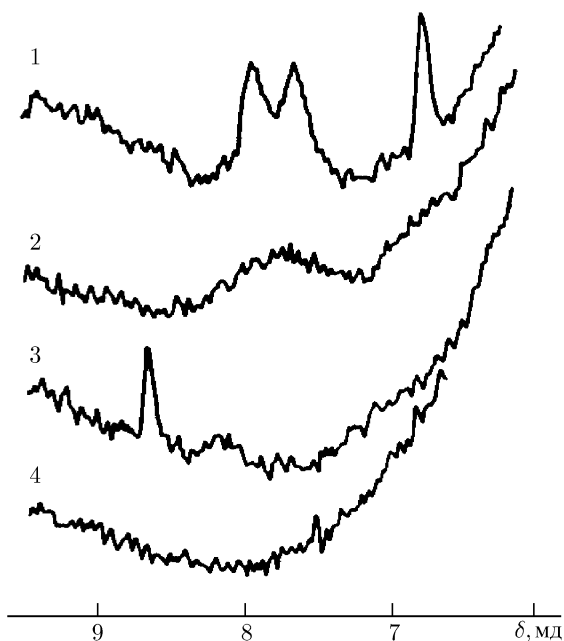


Рис. 26. Ароматическая область спектра протонного резонанса на 80 мГц от фосфолипидных везикул в D_2O , содержащих в своем составе восстановленный витамин K_3 , (1, 2) и динитрофенол (3, 4), до (1, 3) и после (2, 4) добавления 0,5 мМ $MnCl_2$ [29]

тогда как небольшие отклонения от нее позволяют таким соединениям эпизодически выходить в гидрофильную часть мембраны. И именно такие небольшие отклонения способствуют переносу ионов через мембрану, что может заметно влиять на их биологическое действие. Нельзя не отметить, что молекулы, например, нейролептиков, содержат как гидрофильные, так и гидрофобные группы. Все это позволяет прийти к выводу, что и в случае мембран специфичность действия многих биологически активных веществ, как и в других рассмотренных ранее системах, по-видимому, определяется малыми разностными эффектами. При этом воздействие энергии теплового возбуждения служит не только возмущающим фактором, но и, по-видимому, позволяет, за счет изменения местоположения взаимодействующих структур, не ограничивать действие био-

логически активных соединений узкими рамками и способствовать появлению у них полифункциональности действия, характерной для многих биологических систем. Подобное поведение может влиять и на эффективность биологических процессов.

Наконец, следует отметить еще одну сторону воздействия мембранорастворимых биологически активных соединений с участием воды на регуляцию биологических процессов. Она относится к их влиянию, через изменение структуры мембран, на взаимодействие периферических белков с мембранами, большая часть которых слабо связана с ними. Эффекты такого воздействия, по-видимому, занимают особое место в регуляции метаболических процессов на клеточном уровне, и они будут более подробно рассмотрены в следующей главе.

ГЛАВА 5

Роль воды в регуляции биологических процессов на клеточном уровне

5.1. Постановка задачи

Переход к основному — клеточному уровню организации живых систем приводит к необходимости решения принципиально новых задач по регуляции биологических процессов. В клетке, по ряду данных [234, 56], содержится несколько тысяч видов белков, выполняющих весьма разнородные функции, которые при этом должны быть строго согласованы между собой. В число путей решения таких задач входит образование из групп белков организованных систем в пределах мембран [131, 147, 228, 56], а также разделение клеток эукариот на компартменты для выполнения ряда специализированных функций внутри отдельных оргanelл [234]. Существенную роль здесь играет и поддержание гомеостаза внутри клеток [103].

Вместе с тем, подобные системы лишь отчасти решают задачу управления метаболическими процессами, особенно внутри цитоплазмы, где функционирует большое число различных водорастворимых белков, которые могут создавать взаимные помехи. По-видимому, в связи с этим большая часть — а в ряде случаев и подавляющее большинство — белков цитоплазмы находится не в водной среде, а в связанном на мембранах и других внутриклеточных структурах состоянии [234]. Примерно половину поверхности мембран занимают периферические белки, которые связаны с мембранами в основном электростатическими взаимодействиями, и многие из них сравнительно легко отделяются от мембран при повышении ионной силы. Для отделения ряда таких белков достаточно повышения ионной силы всего лишь до значений, эквивалентных 0,15 М NaCl [228].

Связывание белков на мембранах и других клеточных структурах представляет, в сущности, их иммобилизацию, которая, как известно, значительно увеличивает стабильность белков и удлиняет время их функционирования [70]. Иммобилизация водорастворимых белков позволяет также заметно снизить помехи перемещению субстратов в пре-

делах цитоплазмы, хотя само по себе это еще не снимает возможности взаимодействия субстратов не со своими белками, находящимися на весьма разветвленной поверхности мембран внутри клеток, и не решает проблемы координации различных процессов в пределах клетки в целом.

Одновременно возникают и другие проблемы. Как уже отмечалось, оптимальные условия для функционирования белков не совпадают с требованиями к стабильности их структуры, и это противоречие решается таким образом, что уровень теплостойкости белков и связанный с ним уровень их конформационной подвижности коррелируют с температурой среды обитания организмов с непостоянной температурой тела [57]. Постоянное пребывание белков в иммобилизованном состоянии неизбежно нарушило бы такое соответствие, несмотря на наличие данных о том, что скорость ферментативных реакций для некоторых белков мало меняется, а иногда и увеличивается при иммобилизации [70].

Однако исследования на обращенных мицеллах (они окружены извне органическим растворителем, а фермент находится в водной среде внутри мицеллы в контакте с нею [166]) показали, что при этом наблюдается нарушение избирательности реакций и их регуляции. Так, например, в случае фермента алкогольдегидрогеназы вместо октанола оптимальным субстратом становится бутанол [233], тогда как для фермента пероксидазы отсутствует субстратное ингибирование, наблюдаемое в чисто водной среде [134]. В результате при большой концентрации субстрата суммарная скорость реакции может быть увеличена на целый порядок по сравнению с данными для водной среды [116].

Кроме того, постоянная иммобилизация привела бы к повышению устойчивости белков клетки в физиологических условиях к воздействию внешних факторов. В то же время имеющиеся данные указывают, наоборот, на рост чувствительности белков в клетке к различным раздражителям по сравнению с данными опытов *in vitro*, что пытались объяснить увеличением не прочности, а лабильности белков внутри клетки присутствующими в ней физиологическими лигандами [58].

Далеко не ясной остается тогда и роль большого содержания воды в физиологически активных клетках, хотя для функционирования белков необходимо относительно немного воды. Если же протяженная водная среда связана с обеспечением поступления субстратов, то это не объясняет резкое изменение физиологических показателей и даже гибель клеток при потере лишь десятков процентов содержащийся в них воды. Именно такие данные и послужили основанием для представлений о влиянии воды на физиологические процессы, прежде всего в растениях [59, 109, 162].

Сопоставление всех этих и различных других результатов позволило предположить, что вода выполняет некоторую общерегуляторную

функцию на клеточном уровне с возможностью прямого или косвенного воздействия через общую водную среду практически на все имеющиеся в клетке структуры.

5.2. Роль динамики белков в регуляции процессов на клеточном уровне

Наличие равновесия сил в пределах макромолекул белков в воде приводит к относительно быстрым нарушениям их структуры за счет тепловых флуктуаций и короткому времени жизни белков, ограничиваемому эффектами протеолиза [56]. Но вместе с тем существование динамической структуры белков обуславливает появление еще одного важного фактора, связанного с заметным уменьшением энтропии при иммобилизации белков на различных клеточных структурах и ее ростом при нахождении макромолекул белков в воде. Как отмечалось во второй главе, изменение энтропии при иммобилизации каждой из групп белков в пересчете на величину свободной энергии соответствует примерно 1 ккал/моль. При этом благодаря изменению большого числа степеней свободы для движения отдельных групп в случае макромолекулярного типа организации создаются условия, когда результирующее изменение свободной энергии для перехода белков из связанного состояния в свободное и обратно будет небольшим. Вместе с тем, существенную роль здесь может сыграть наличие относительно большого барьера для перехода (рис. 27). Разность значений свободной энергии между состояниями 1 и 2 всего лишь в 3 ккал/моль обуславливает различие заселенностей этих состояний как 1 : 100 при комнатной температуре. В то же время для преодоления барьера, например, в 20 ккал/моль потребуется около 10 с, причем те же 3 ккал/моль, отнесенные к величине барьера, будут увеличивать или уменьшать это время в сотню раз.

Следовательно, заселенности подобных состояний могут меняться при изменении условий внутри клетки в относительно небольших

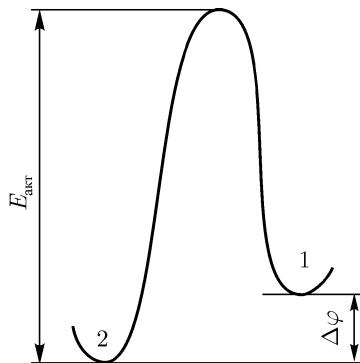


Рис. 27. Профиль свободной энергии $\Delta\varphi$ для перехода между двумя состояниями белка: 1 — свободное, при пребывании белка в воде, 2 — связанное, при иммобилизации белка на мембране

пределах или при действии различных других внешних или внутренних факторов, что позволяет использовать данную систему как весьма чувствительный регулятор клеточных процессов [13, 255]. Если одно из состояний, например нижнее, является связанным и неактивным, то уже повышение его энергии под действием каких-либо факторов на 5 — 6 ккал/моль должно приводить к полному перераспределению заселенностей обоих состояний и переходу подавляющего большинства белков в активное состояние в водной среде.

Принципиальное значение для функционирования рассмотренной выше системы имеет не только малое различие значений свободной энергии для двух ее состояний, но и наличие достаточно большого барьера для перехода между ними. В результате при сохранении требований к малой величине необходимого воздействия оно должно иметь некоторую минимальную длительность. Это резко снижает возможность влияния различных случайных помех, а также, как будет видно далее, может заметно влиять на специфичность действия различных факторов регуляции.

Учитывая все эти возможности, попытаемся объяснить приведенные в начале главы данные об особенностях состояния водорастворимых белков в клетках. Высокая чувствительность белков к внешним воздействиям, достигаемая в водной среде, необходима только для функционирующих белков. И если из многих видов белков функционирует лишь часть, различная в разных условиях, то совсем не обязательно подвергать остальные белки опасности быстрого разрушения в водной среде за счет воздействия протеолиза. Иммобилизация нефункционирующих белков на мембранах и других внутриклеточных структурах позволяет существенно удлинить время их жизни, в том числе и за счет повышения устойчивости к протеолизу [139]. Однако рост стабильности белков одновременно приводит к потере их избирательности, что может нарушить нормальную работу клетки. Это вызывает необходимость частичного или полного ингибирования активности таких белков. Имеются, в частности, данные, что связывание фермента глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (ГАФД) с теньями эритроцитов приводит к частичному или полному ингибированию его активности [228]. Другим примером белка, неактивного при его связывании на мембране, является кальмодулин [311]. Наблюдала также потерю активности альдолазы и ряда других белков при их связывании на мембране [228].

Вместе с тем иммобилизованные ферменты могут быть легко переведены в водную среду, если такая необходимость возникает. Наличие малых различий в величине свободной энергии между связанным и свободным состояниями следует из данных о возможности отделения многих периферических белков от мембран уже при повышении ионной

силы до 0,15 М NaCl [228]. Такие различия определяют и необходимость поддержания показателей гомеостаза внутри клеток, в том числе величины рН в узких пределах, хотя скорость ферментативных реакций не так чувствительна к величине рН при его изменении в пределах единицы в ту и в другую сторону [93, 94]. В условиях же клетки даже слабое воздействие извне, обусловленное, например, появлением субстрата реакции и его взаимодействием с гидрофобным участком макромолекулы фермента, будет повышать сродство белка к воде с возможностью его перехода из связанного состояния в воду для активного функционирования. Повышение сродства к воде достигается и ионизацией отдельных групп в макромолекулах, что непосредственно установлено для кальмодулина, у которого ионизация одной из групп вызывает его переход в воду и появление у этого белка способности связывать кальций [311]. Имеются данные и о десорбции ферментов с внутриклеточных структур различными метаболитами [212].

Высокая чувствительность процессов перехода белков из связанного в свободное состояние позволяет предложить возможный механизм действия находящихся в мембранах рецепторов, если они прямо не связаны с непосредственной передачей возбуждения на другие структуры. Воздействие на мембранные рецепторные белки, несомненно, меняет их положение в пределах мембраны, что в состоянии обеспечить необходимое для перехода изменение энергии связывания для некоторого числа близко расположенных периферических белков. Такой же переход может быть вызван и воздействием биологически активных веществ, многие из которых являются липидорастворимыми и, казалось бы, не должны оказывать прямого влияния на проходящие в цитоплазме процессы. Тем не менее, в пользу такого влияния говорят данные ЯМР об эффектах включения ряда нейролептиков в состав фосфолипидных везикул. При этом они влияют на сдвиг протонного резонанса *N*-метильных групп, вызванный их взаимодействием с парамагнитными ионами Pr^{3+} , и, следовательно, на взаимодействие полярных групп фосфолипидов с ионами [79].

5.3. О регуляторной роли ионов кальция в клеточных процессах

Особый интерес вызывает возможный механизм действия различных ионов на биологические процессы, прежде всего, ионов Ca^{2+} , который является весьма важным фактором активации метаболических процессов в клетке [138], причем эти ионы взаимодействуют не только с белками, но и с липидами. Взаимодействие ионов кальция с отрицательными зарядами на внутренней поверхности мембран должно приво-

доть к ослаблению электростатических взаимодействий периферических белков с мембраной и, соответственно, вызывать их переход в водную фазу. Но здесь определенные возражения может вызвать весьма низкая концентрация ионов Ca^{2+} (10^{-7} М) в клетке, которая на несколько порядков ниже концентрации другого двухвалентного иона — магния, не вызывающего столь значительного активирующего воздействия на клетку.

Однако именно биологическая эффективность и приводит к низкой концентрации ионов кальция — константа взаимодействия ионов Ca^{2+} с мембраной в 3000 раз выше соответствующей константы для ионов Mg^{2+} [75]. В результате лишь один ион Ca^{2+} из 10000 находится в растворе, тогда как остальные в связанном состоянии прежде всего на отрицательно заряженной внутренней поверхности мембраны. В то же время для 1000 ионов Mg^{2+} соотношение заселенностей таких состояний будет примерно 300 : 700. Подобное различие энергий связи будет вызывать и столь же большое различие времен жизни для этих ионов в связанном состоянии, что имеет важное значение для проявления ожидаемых биологических эффектов в данной области.

Переход белка из связанного на мембране состояния в водную среду требует преодоления потенциального барьера. Поэтому время жизни иона, связывание которого вызывает подобный переход, должно быть не меньше времени, необходимого для преодоления барьера под действием энергии теплового возбуждения. При величине барьера 20 ккал/моль требуемое время составит не менее 10 с. Если данное время жизни отнести к ионам кальция в связанном состоянии, то для ионов магния это время будет лишь 3 мс, т. е. более чем на 3 порядка короче по сравнению с ионами кальция (принимая, что положение уровней энергии для связанного и свободного состояний примерно, хотя и не строго, отражает изменение величины потенциального барьера).

Следовательно, и здесь приходится иметь дело с парадоксальной ситуацией: именно низкая концентрация ионов Ca^{2+} как раз и отражает эффективность его биологического действия. При этом концентрация данных ионов во внеклеточном пространстве на несколько порядков выше (из-за положительного заряда внешней стороны мембраны). Достаточно велика и их общая концентрация в клетке — в мембранах саркоплазматического ретикулула на 1 мг белка приходится 100–300 нМ Ca^{2+} [75]. В пересчете на белок с массой 100000 Да получаем, что на 1 макромолекулу такого белка приходится от 10 до 30 ионов кальция, тогда как в пересчете на липидную часть мембран, принимая ее общую массу равной общей массе белка, имеем от 1 до 3 ионов Ca^{2+} на 10 молекул фосфолипидов с молекулярной массой 1000 Да. К тому же один ион кальция способен образовывать связь между двумя молеку-

лами фосфолипидов. И хотя значительная часть кальция депонирована в органеллах [138], оставшегося количества, по-видимому, вполне достаточно для эффективного воздействия на регуляцию метаболических процессов в клетке, особенно если учесть включение в них при необходимости и депонированного кальция.

Вместе с тем следует учитывать, что создание условий, позволяющих производить регуляцию метаболических процессов путем относительно слабых воздействий на основе определенного равновесного распределения белков между связанным и свободным состояниями, является весьма сложным процессом. Белки имеют различные значения изоэлектрической точки, разный общий заряд, массу и величину поверхности своего взаимодействия с мембраной. Уже поэтому для появления необходимых для регуляции условий требуется участие нескольких факторов. Известно, что воздействия одних лишь ионов кальция недостаточно для появления искомых эффектов — они возникают лишь при наличии и других ионов [138]. Последние, по-видимому, необходимы для создания условий частичного экранирования электростатического взаимодействия между белком и мембраной.

В определении близкого к равновесному распределения белков определенную роль должны играть и различные виды липидов, содержащиеся в мембранах. Тот же кальций в зависимости от места своего связывания между разноименными или одноименными зарядами белка и мембраны должен либо упрочнять, либо ослаблять связь белка с мембраной, и эффекты такого рода реально наблюдались в экспериментах ([228] и т. д.) При этом, учитывая случайный характер процессов под действием энергии теплового возбуждения, следует допустить участие нескольких ионов кальция во взаимодействии белка с мембраной, когда добавление или уход одного из них играет пусковую роль в процессах перехода белка из одного состояния в другое.

Рассмотренные выше предположения получили определенное экспериментальное подтверждение. В частности, для водорастворимых белков из печени крысы было показано, что их связывание на мембранах является обратимым и что они связывались на мембранах или переходили в водную среду при изменении концентрации ионов Ca^{2+} в среде [333]. Другим примером является высвобождение белков с мембраны под действием ионов кальция в процессе проведения нервного импульса [352].

5.4. Об эффектах «динамики живой протоплазмы»

Помимо этих прямых результатов существует большое число косвенных данных, которые следует рассматривать как эффекты изменения

положения белков под действием ионов кальция, биологически активных веществ, гормонов, продуктов метаболизма и т. д. Уже в течение многих лет известно, что прохождение любого метаболического процесса сопровождается изменением вязкости цитоплазмы [58, 96, 174]. Наблюдали также изменение светорассеяния клеточными структурами и распределения красителей в пределах клеток. Еще более значительные изменения таких характеристик отмечались при действии различных повреждающих агентов.

Подобные данные в свое время послужили основой для представлений о так называемой «коллоидной теории протоплазмы» [96]. Потом такие факты пытались объяснить с помощью денатурационной теории раздражения и повреждения, связывая наблюдаемые процессы с изменением состояния белков внутри клеток, с появлением у них высокой чувствительности к внешним воздействиям [174]. Позднее было выдвинуто предположение о стимуляции активности белковой макромолекулы физиологическими лигандами, когда в ней происходят изменения конформации, идущие по пути начальных этапов денатурации, по пути ее лабильзации [58]. Но все эти предположения оставляли в стороне конкретные механизмы появления у белков в клетке подобной высокой чувствительности.

С нашей точки зрения, все обсуждавшиеся ранее явления получают достаточно простое объяснение: изменения вязкости цитоплазмы, распределения красителей, светорассеяния и т. п. определяются изменением местоположения белков в пределах клетки. Белки связаны на мембране — вязкость цитоплазмы низкая, тогда как переход белков в воду под действием физиологических или патологических агентов будет повышать вязкость цитоплазмы вплоть до гелефикации внутреннего содержимого клетки (так называемый «золь-гель» переход [96]). Вместе с белками, естественно, меняется и местоположение красителей, связанных белками — гранулообразование в покое и диффузное распределение в ходе раздражения или повреждения клетки [58, 96, 174].

Относительно просто объясняются и данные по светорассеянию: длина волны света заметно больше толщины самих мембран или размера каждого из белков, и они отдельно должны слабо рассеивать свет. Расположение белков на мембране увеличивает размер неоднородности системы, что будет повышать и светорассеяние. Переход относительно небольшой части белков с мембраны на первых этапах будет приводить к уменьшению рассеяния света, что находится в соответствии с наблюдаемыми данными. Но в последующем, по мере увеличения количества белков в цитоплазме, взаимодействие между ними должно приводить к появлению ассоциатов белков и, соответственно, к возрастанию светорассеяния, реально наблюдаемого в экспериментах [58].

Особенно важно подчеркнуть, что предлагаемое объяснение позволяет подойти к выяснению физико-химического механизма столь высокой чувствительности наблюдаемых явлений к различным воздействиям, не прибегая к предположениям о каких-то неизвестных свойствах белков в клетках [174]. Основу для подобного механизма предоставляет учет особенностей взаимодействия белков с водой, где происходит заметное увеличение конформационной подвижности белков с ростом числа степеней свободы для движения отдельных групп. В результате возникают условия для переходов белка из связанного состояния в воду и обратно при малом изменении свободной энергии.

Весьма существенно, что наличие малой разности свободных энергий при относительно большом барьере для перехода позволяет использовать для регуляции воздействия, лишь немногим превышавшие по своей величине значения kT , но вместе с тем резко снижающие вероятность случайных воздействий за счет ограничений на минимальную их длительность. Подобно тому, как повышение постоянной времени в радиотехнических устройствах приводит к выделению слабого полезного сигнала за счет усреднения шумов, имеющих случайный характер, так и увеличение барьера и, соответственно, времени жизни белка в определенном состоянии позволяет снизить влияние помех и производить нужные воздействия за счет слабого, но либо имеющего систематический характер, либо достаточно длительного управляющего сигнала. В свою очередь, это вносит определенные ограничения на скорость различных физиологических реакций, но делает их весьма чувствительными к воздействию факторов внешней среды с возможностью включения, в ответ на них, различных компенсаторных систем. Примеры такого рода будут приведены далее (см. также главу 7).

5.5. Сорбция–десорбция белков как фактор регуляции активности в клетке

Функциональная активность белков не обязательно связана с их пребыванием в воде, даже для водорастворимых белковых макромолекул. На мембранах адсорбированы различные мультиферментные комплексы — в частности, ферменты системы гликолиза или цикла трикарбоновых кислот [125, 216, 228], регуляция работы которых может осуществляться, наоборот, за счет сорбции белков на мембранах, на которую заметно влияют различные метаболиты [148, 228, 317]. Но основу для подобных процессов опять же составляют особенности взаимодействия белков с водой, позволяющие влиять на их регуляцию путем весьма слабых воздействий.

Приведенные здесь данные позволяют рассматривать процессы сорбции–десорбции белков на мембранах и других биологических структурах под действием физиологически активных веществ, гормонов, нейрорепептиков, анестетиков и т. д., различных метаболитов, ионов кальция, поступления субстрата реакции и многих других в качестве одного из основных механизмов регуляции метаболических процессов в пределах клетки.

В состоянии покоя большая часть периферических белков, способных к переходу в водную среду и функционированию в ней, связана на мембранах и неактивна. Иммобилизация белков на мембранах или других биологических структурах, как известно, позволяет существенно удлинить время их жизни и снизить доступность таких белков для протеолиза, а также заметно уменьшить помехи для работающих в воде других белков. Состоянию покоя соответствует и высокая вязкость примембранного «кортикального» слоя [96]. Появление, например, субстрата реакции или кофермента вызывает десорбцию нужного фермента. Примерами таких процессов являются десорбция глицеральдегид–3–фосфатдегидрогеназы под воздействием субстрата глицеральдегид–3–фосфата или коферментов 2,3–ди–фосфоглицерата, НАД, НАДН с увеличением его активности, при десорбции альдолазы из мышц кролика под действием фруктозы 1,6–бисфосфата с микросомальных мембран также с ростом активности и некоторых других [228]. Для ряда ферментов, обычно включенных в мультиферментные комплексы, наблюдался и противоположный процесс — увеличение их активности при сорбции [147, 228, 317].

Другие факторы сорбции–десорбции ферментов — это воздействие физиологически активных веществ, примерами которых является обратимое связывание ГАФД под влиянием ряда таких веществ или отделение гексокиназы от мембран под действием анестетиков [228]. Избирательными агентами, по-видимому, являются также гормоны, воздействие на рецепторы и т. д.

Вместе с тем, имеются и такие агенты, как Ca^{2+} , pH, кальмодулин, циклическая АМФ и некоторые другие, которые влияют на общий метаболизм клетки. Наиболее вероятный механизм, объясняющий общий характер их воздействия, связан с их влиянием на сорбирующие свойства мембран в целом. Существование подобной системы с возможностью быстрого включения в метаболизм большого количества ранее сорбированных ферментов позволяет резко менять уровень клеточного метаболизма за время, в течение которого не успевают включиться процессы биосинтеза. Так, например, общий уровень метаболизма летающих насекомых возрастает в течение 1 мин в 100 раз [234], тогда как при синтезе белка в рибосоме за 1 с формируется лишь около 10 пептидных групп [220].

Важное значение имеет и обратная реакция — сорбция белков, позволяющая резко снизить энергетические затраты организма. Белок в воде распадается значительно быстрее, чем на мембране, что требует, помимо затрат на выполнение работы, дополнительного расхода энергии на биосинтез. Имобилизация белков (например, при гормональном воздействии при переходе в анабиоз) позволяет существенно снизить распад белков и расход энергии на внутренний метаболизм, обеспечивая таким образом сохранение жизнеспособности теплокровным животным в течение нескольких месяцев на основе относительно небольших запасов. Подобный механизм может объяснить и эффекты гормональных препаратов на снижение затрат на внутренний метаболизм при откорме сельскохозяйственных животных.

Сорбция белков на мембранах приводит также к увеличению устойчивости и самих белков, и мембран к повреждающим воздействиям. Сохраняется также и их распределение на определенных участках мембран, которое делает контролируемой всю систему в целом. Такие данные могут объяснить известные результаты по повышению устойчивости организмов к различным факторам внешней среды в состоянии анабиоза [245, 100]. С аналогичным эффектом повышения устойчивости тканей при снижении их метаболизма под действием токсических веществ в подпороговых концентрациях, возможно, связано удлинение времени переживания таких тканей, отмечаемое в ряде работ [100, 58].

Еще одна группа эффектов связана с влиянием на клетку повреждающих воздействий. Самые различные повреждающие агенты — такие, как температура, высокое гидростатическое давление, соли, спирты, нарушение целостности мембраны и т. д. — приводят к весьма близким результатам: повышению вязкости протоплазмы, светорассеяния и к перераспределению красителей внутри клетки [58]. Подобная ответная реакция, по-видимому, связана с нарушением гомеостаза внутри клеток, поддержание которого является условием сохранения определенного распределения белков между связанным и свободным состояниями. В результате большинство белков переходит в цитоплазму, образуя неконтролируемые ассоциации, что, по-видимому, и определяет наблюдаемые изменения.

Этот вывод подтверждается также при анализе результатов изучения распределения воды внутри клеток методом ЯМР. Пока в клетках поддерживается гомеостаз (например, в тканях животных сразу после их извлечения или при наблюдении непосредственно в организме методом ЯМР-томографии), кривая спада спинного эха от протонов воды имеет сложный неэкспоненциальный характер [288]. Это свидетельствует о гетерогенном распределении взаимодействующих с водой структур в пределах клетки, которое довольно быстро нарушается после извлече-

ния образца ткани животного, с появлением обычной экспоненциальной кривой спада для протонов воды

Повреждающие воздействия, такие, как кислоты, щелочи, токсические вещества, в ряде случаев приводят к странным, казалось бы, эффектам — стимуляции деления клеток [58, 96]. Но подобный эффект вполне объясним за счет сдвига гомеостаза внутри клеток. Сборка микротрубочек — как один из этапов деления — проходит при сдвиге величины рН внутри клеток на 0,4 ед в щелочную сторону. Возвращение величины рН к норме прерывало этот процесс, тогда как искусственное повышение рН в неделящихся яйцах морского ежа стимулировало в них процесс сборки микротрубочек [331]. Еще ранее было показано, что в процессе деления происходит заметное изменение вязкости протоплазмы, имеющее несколько этапов, причем на первом этапе высвобождается кальций и резко увеличивается вязкость [96]. В то же время в состоянии анабиоза зарегистрирован сдвиг рН на 0,3 ед в кислую сторону [331].

Наблюдаемые изменения показывают, что сдвиг гомеостаза, по-видимому, необходим для включения в процесс деления ранее прочно связанных белков, возможно, с одновременной сорбцией других, отличающихся по величине своих суммарных зарядов и зарядового взаимодействия с мембраной. Известны данные, что начальные стадии активации яйцеклетки не зависят от образования каких-либо новых белков, так как они протекают совершенно нормально в присутствии ингибиторов белкового синтеза [56]. Следовательно, и данный процесс находит объяснение как еще один механизм регуляции клеточных процессов, основанный на использовании возможности перераспределения участвующих в них белков между связанным и свободным состояниями.

5.6. О роли состояния воды в клетке

Учет возможности перераспределения белков при слабых воздействиях позволяет на новом уровне вернуться к проблеме состояния воды в организмах и его предполагаемого изменения в ходе физиологических процессов [162, 59, 109]. Как уже отмечалось, различные физические методы не обнаружили ожидаемых изменений. Однако если физиологические процессы влияют на местоположение белков, то для изменения вклада в их равновесное распределение со стороны водного компонента, например, при уменьшении оводненности клеток, необходимо менее 10 ккал/моль из общей энергии гидратации на макромолекулу белка порядка 10^3 ккал/моль, т.е. порядка процента от этой величины. Такие изменения состояния воды практически невозможно обнаружить

с помощью современных физических методов. В то же время указанные авторы предполагали совершенно другие эффекты, которые относили к значительному изменению соотношения между свободной и связанной водой. На самом деле изменения испытывает, по-видимому, лишь слабосвязанная вода, но этих изменений в общем достаточно, чтобы получить реальные биологические эффекты. Если же изменение вклада со стороны воды будет более значительным, например, при большей потере воды, то это может привести к неконтролируемым нарушениям распределения белков в пределах клетки (при отсутствии других воздействий, упрочняющих связь белка с мембранами). Подобные нарушения, по-видимому, и определяют высокую чувствительность клеток животных и высших растений к потере воды сверх некоторого предела.

Следует обсудить также возможные эффекты талой и кипяченой воды, которым ряд авторов [121, 172] приписывает активное биологическое действие, связывая его с изменением состояния воды в результате подобной обработки и наличием у воды структурной памяти. Но можно рассмотреть и другую возможность. Кипячение, как и замораживание, удаляет из воды значительную часть растворенных газов, в том числе CO_2 , что приводит к сдвигу величины рН воды в щелочную сторону на несколько десятых долей [121]. Вместе с тем известно, что значение рН в клетке поддерживается с хорошей точностью. Но это относится, прежде всего, к ионам, содержание которых контролируется с помощью работы различных АТФаз [75], тогда как для газов в клетке подобный механизм неизвестен. Было предположено, что нахождение клеток в воде с частично удаленным газом должно приводить к выходу растворенных газов из клетки, в том числе CO_2 , и к повышению в ней величины рН. Измерения с помощью микроэлектродной техники подтвердили данное предположение: помещение клеток водорослей *Nitella* в свежekiпяченую воду повышало величину рН в клетке примерно на 0,2–0,25 ед., тогда как замена этой воды на обычную возвращала рН к норме [266]. Подобный же эффект можно ожидать и от талой воды, причем сдвиг рН здесь действительно происходит в сторону активации процессов, хотя состояние воды к этому не имеет отношения. К сожалению, в экспериментах основное внимание обращают на чистоту воды, а состав газов в воде обычно не контролируют, что, естественно, приводит к плохой воспроизводимости результатов из-за быстрого установления в открытых сосудах равновесия между водой и окружающей средой по составу газов.

Изменение величины рН, но уже в кислую сторону, происходит и при замене обычной воды на тяжелую, и это частично обуславливает связанные с такой заменой биологические эффекты [159]. Соответствующее обратное смещение величины рН, например в клетках хлореллы,

позволило существенно уменьшить различия в воздействии H_2O и D_2O на процессы фотосинтеза [219]. Связанные с изменением величины pH эффекты торможения физиологических процессов в клетке следует учитывать и при обсуждении наблюдавшегося в экспериментах повышения стабильности клеток и клеточных структур при замещении обычной воды на тяжелую [58].

Существует и еще одна возможность изменения вклада воды во внутриклеточное равновесие. Исследования на водных полимерных двухфазных системах показали, что вода и водные растворы отличаются по своей относительной гидрофобности [120]. Так свободная энергия переноса CH_2 -группы из воды в 0,11 М фосфатный буфер pH 7,4 меняется примерно на 0,1 ккал/моль [362]. Определенные различия по относительной гидрофобности, достигающие десятков калорий на моль на одну CH_2 -группу, отмечаются также между плазмой крови и различными тканевыми жидкостями [362]. Хотя наблюдаемые различия невелики, но, принимая во внимание число метиленовых групп на поверхности макромолекул белков, получим, что суммарные различия свободной энергии при пребывании макромолекул в крови или внутри различных клеток могут достигать уже единиц ккал/моль с соответствующим различием их концентраций в десятки и более раз.

Равновесное распределение водорастворимых белков между различными состояниями в пределах клетки определяется воздействием не только со стороны воды, но и со стороны мембран. Наличие в составе мембран сотен видов липидов в общем позволяет проводить достаточно тонкую настройку равновесия в различных участках мембран при взаимодействии с различными белками. При этом вклад со стороны липидного компонента мембран может меняться в зависимости от физиологического состояния клеток, что подтверждается данными об изменении липидного состава мембран микроорганизмов при переходе от состояния покоя к логарифмической фазе роста, причем отчетливые изменения наблюдаются уже вскоре после начала роста [123]. Заметное влияние на взаимодействие белков с липидным компонентом мембран, как уже отмечалось, оказывают и различные липидорастворимые биологически активные соединения. Все это в целом позволяет активно воздействовать как на отдельные биологические процессы, так и на общий метаболизм клетки в целом.

Рассмотренные выше данные, однако, не отрицают возможности активного функционирования ряда глобулярных белков и в связанном на мембранах и других клеточных структурах состоянии. Функции белков весьма различны, и далеко не ко всем предъявляются жесткие требования к избирательности и необходимости слабых воздействий для управления ими, особенно если их функционирование связано с высокими по

энергии переходами, как в фотобиологических процессах. Часть белков находится и в составе мультиферментных систем, где регуляция осуществляется, наоборот, за счет сорбции белков, хотя и здесь важную роль играют слабые воздействия, основанные на равновесии сил с участием воды. Но все же доля таких белков, исходя из значительных изменений вязкости и других характеристик цитоплазмы при активации клеточного метаболизма, по-видимому, не так уж велика (если исключить структурные белки).

5.7. Заключение

Таким образом, представления о наличии в клетках определенного равновесия в распределении белков между активным в воде и связанным и неактивным на мембранах и других структурах состояниями, а также с возможностью их перераспределения при относительно слабых воздействиях позволяют объяснить с единой точки зрения огромное количество полученных ранее данных, не прибегая к предположениям о каких-то особых свойствах белков или других структур в клетках. Это дает возможность также для интерпретации с физико-химической точки зрения результатов исследований по так называемой динамике живой протоплазмы [96] и их использования как вполне добротного экспериментального материала, в общем согласующегося с данными более современных методов. Появляется возможность и для рассмотрения на их основе других, ранее не обсуждавшихся проблем.

Высокая чувствительность процессов сорбции–десорбции белков на мембранах к различным воздействиям допускает возможность изменения распределения белков между разными состояниями, например, за счет соприкосновения и взаимодействия двух мембранных структур при клеточных контактах в организме животных, у которых, в отличие от растений, отсутствует клеточная стенка. В полном соответствии с фактами стимуляции деления клеток различными раздражителями, включая и такие, как укол клетки, вполне реален и противоположный процесс — торможение деления за счет более прочного связывания участвующих в делении белков и других структур на клеточных мембранах при таких контактах. Возможность влияния взаимодействия мембран с другой поверхностью на состояние цитоплазмы подтверждается данными по гелефикации внутреннего содержимого амебы при ее взаимодействии с поверхностью стекла [96].

Следует упомянуть также о возможном влиянии на процесс морфогенеза асимметрии состояния мембран и связанных на них белков у клеток, находящихся во внешних и внутренних слоях [56]. Не исключено,

что это является одним из факторов, определяющих дифференциацию клеток в ходе данного процесса.

Расположение на мембранах белков, сформированных и функционирующих в водной среде, ставит и дополнительные вопросы, связанные с сохранением ими нативной (для воды) структуры при длительном пребывании белков в сорбированном состоянии на мембране. В воде нарушения структуры довольно быстро устраняются системой протеолиза, тогда как белки на мембранах значительно менее доступны для протеолиза. В этой связи не исключена необходимость хотя бы эпизодической проверки состояния таких белков с их переходом в водную среду при активации метаболизма.

Последнее еще раз показывает, что в живых системах, по-видимому, не существует таких состояний, которые позволили бы на основе выбора того или иного варианта однозначно решить требуемую задачу. Постоянно приходится искать некий оптимум, положение которого должно меняться в зависимости от изменения условий. Так, например, повышение прочности приводит к проигрышу в избирательности, тогда как длительное время жизни системы в одном состоянии чревато определенными нарушениями в работе такой системы. Выбор ионов в зависимости от времени их жизни в определенных состояниях, в свою очередь, предопределяет соотношение порогов реакций и их времена. В данном случае речь идет об ионах Ca^{2+} , частичная замена которых на тяжелые ионы может существенно нарушить подобное согласование и резко увеличить время жизни белков в связанном состоянии. С этим, по крайней мере частично, может быть связан их общетоксический эффект.

Подобная взаимосвязь существует и в других случаях. Необходимость достижения высокой энергетической эффективности биологических реакций предопределяет различие порогов прямых и обратных реакций за счет использования конформационной динамики биологических макромолекул или более сложных систем, что существенно замедляет время их прохождения. В то же время высокая скорость, например, начального этапа первичных процессов фотосинтеза оплачивается затратой части энергии светового кванта и т. д. Более высокая избирательность реакций у высших форм требует более жесткого поддержания гомеостаза, что связано с дополнительными затратами энергии, а также со снижением устойчивости к различным внешним воздействиям и т. д.

Таким образом, вода наряду со своим регуляторным воздействием на процессы функционирования белковых макромолекул и мембранных структур играет несомненную общерегуляторную роль также на уровне клетки в целом. Благодаря этому появляется возможность, не ограничиваясь выделением ряда организованных систем в мембранах или в пределах различных органелл, осуществлять избирательное управление весь-

ма большим числом разнородных метаболических реакций, происходящих внутри клетки в общей для всех них водной среде.

Близость значений свободной энергии для связанного и свободного состояний белков позволяет решить двойственную задачу: существенно удлинить время жизни иммобилизованных нефункционирующих структур и, по мере необходимости, избирательно включать их в метаболизм с минимумом взаимных помех в общей для всех водной среде и с возможностью воздействия на все такие процессы через единую для них среду. При этом нет необходимости в использовании некоей генерализованной перестройки клеточных мембран [136]. Малая величина необходимых для управления воздействий позволяет использовать для данной цели не только непосредственно взаимодействующие с белками вещества (например, метаболиты, другие белки, ионы и т. д.), но и косвенно влиять на степень связывания белков через мембранные рецепторы, липидорастворимые биологически активные соединения, гормоны, через изменение липидного состава мембран и другие факторы. Вместе с тем, зависимость наблюдаемых эффектов от времени воздействия позволяет многократно снизить влияние различных случайных факторов, а также осуществить резкую дифференциацию ионов по характеру своего биологического действия, включая специфичность действия ионов кальция.

Еще одной важной стороной подобной системы является возможность резкого повышения или снижения интенсивности метаболических процессов или же перехода к другому режиму функционирования путем общего сдвига равновесия в клетке, в том числе за счет изменения характеристик гомеостаза в определенных пределах. Такой сдвиг, по-видимому, обуславливает включение в активный процесс структур, участвующих в делении клеток, либо переход клеток в анабиотическое состояние и обратно и т. д. Наличие такого рода системы делает клетки весьма чувствительными и к межклеточным взаимодействиям, что должно влиять на контактное торможение деления клеток, возможность их дифференциации при морфогенезе и на другие процессы. В целом это создает физико-химическую основу для регуляции самых различных физиологических процессов с помощью различных слабых управляющих воздействий.

ГЛАВА 6

Состояние воды и биологическая активность (по данным исследований на семенах растений)

6.1. Введение

Известно, что содержание воды в активно функционирующих клетках обычно в несколько раз превышает содержание сухого вещества. В предыдущей главе был рассмотрен механизм регуляции метаболических процессов на клеточном уровне, основанный на активации переходов белков из связанного на мембранах состояния в воду или обратно с помощью слабых управляющих воздействий. Возможность реализации такого механизма определяется наличием в клетке объемной водной фазы, что, с данной точки зрения, должно быть необходимым условием для активного функционирования живых систем. Из условий выполнения регуляторных функций на клеточном уровне следует также зависимость метаболизма от содержания воды и от ее состояния, что действительно имеет место в организмах, вплоть до того, что для ряда форм жизни потеря даже относительно небольшой части воды способна вызвать их гибель.

Подобное предположение, казалось бы, противоречит имеющимся данным о возможности прохождения многих биологических процессов при низкой влажности. На такую возможность указывают и результаты наших исследований динамики белков и мембран в связи с функциональной активностью данных структур. Они показали, что ряд биологических процессов проходит не только при участии лишь сравнительно небольшого количества воды, но и при этом становятся возможными также определенные виды регуляции (см. главу 4). Однако сказанное все же относится лишь к отдельным типам реакций, тогда как существование организмов определяется не только ими, но и возможностью прохождения полного цикла метаболических процессов, который, согласно данным представлениям, должен зависеть от наличия отдельной водной фазы внутри клеток.

Вместе с тем известно, что такие важные для практики объекты, как семена растений, способны активно развиваться в условиях, когда содержание воды в них составляет лишь относительно малую долю их веса. Подобное явление имеет место и в процессе созревания, и в процессе прорастания семян [277]. И хотя содержание воды в зародыше семян обычно заметно больше, чем, например, в эндосперме, но и в нем проходят активные метаболические процессы, для которых также должно быть существенным наличие отдельной водной фазы (объемной воды).

Данное явление, на первый взгляд, не согласуется с представлениями о важной роли рассматриваемого механизма регуляции, что ставит под вопрос распространенность и саму его необходимость для активного функционирования живых систем. Для выяснения возможной природы отмеченного противоречия были выполнены исследования состояния воды и особенностей ее распределения в семенах пшеницы в ходе процессов их созревания и прорастания. Полученные при этом данные отражают также определенные стороны регуляторной роли воды непосредственно в живых системах, включая и возможные механизмы воздействия со стороны воды. Результаты подобных исследований представляют и самостоятельный интерес в связи с исключительно важным практическим значением семян растений.

Для изучения состояния воды на разных стадиях созревания и первых этапах прорастания семян использовали метод спинного эха ЯМР, а пространственное распределение водной фазы в семенах пшеницы оценивали методом ЭПР-томографии [250, 334] по двумерной картине распределения растворенного в воде спинного зонда ТМОПО в различных местах продольного или поперечного среза семени. Связь зонда с объемной водной фазой подтверждалась регистрацией близкого к синглетному сигнала ЭПР от зонда из-за его обменного сужения в жидкой фазе [118]. Использовали также люминесцентные [84, 85] и некоторые другие методы. Условия экспериментов более подробно изложены в статьях [19, 20, 32, 33, 39, 55, 101, 218, 259, 345].

6.2. Состояние воды и ее распределение в семенах пшеницы на начальных этапах их прорастания

Исследования кривых спада спинного эха от протонов воды проводили при набухании семян пшеницы в обычной H_2O и в тяжелой воде D_2O , что позволило получить сведения не только о состоянии воды и его возможном отличии в различных частях семени, но и выделить вклад от воды, исходно находившейся в клетках эндосперма, для оценки его изменений в ходе процесса набухания. Для этой цели использовали

компонент спада спинового эха с временем релаксации $T_2 = 0,4$ мс, который регистрируется в воздушно-сухих семенах пшеницы и принадлежит к относительно подвижной воде, связанной крахмалом эндосперма. Еще одна часть воды на молекулярном уровне связана более прочно, и вклад от нее в кривую спада спинового эха из-за роста подвижности наблюдается лишь при нагреве семян до 50°C и более [19]. Тем не менее, и при нагреве, несмотря на наличие подвижности на молекулярном уровне, и та, и другая вода с трудом извлекаются из семян даже после многочасовой сушки при 105°C , что указывает на наличие определенных препятствий для удаления воды из семян. Существование таких препятствий проявляется и в процессе набухания семян пшеницы.

При набухании семян пшеницы в обычной воде уже спустя 1 ч после его начала как в зародыше, так и в эндосперме (зародыш после набухания отделяли непосредственно перед измерениями) было зарегистрировано появление медленного компонента спада спинового эха от протонов с $T_2 = 15 \div 20$ мс, который соответствует воде в жидкой фазе. Такой же эффект наблюдали при набухании семян в тяжелой воде, хотя и с некоторым запозданием (рис. 28) [20, 32], что обусловлено вкладом в медленный компонент спада в основном от протонов ранее связанной воды. Появление объемной жидкой воды, в которой растровен спиновый зонд, менее чем через 1 ч после начала набухания было затем показано методом ЭПР томографии, причем не только внутри и вблизи зародыша, но и в противоположной от него части эндосперма [101]. Эти данные показывают, что в пределах семени существуют области, помимо зародыша и сосудистой системы в эндосперме, где достаточно быстро может появиться вода в объемной жидкой фазе. И как будет видно далее, именно с этой водой связана резкая активация дыхания семян.

Вместе с тем, в ходе набухания семян, наряду с медленным компонентом, было выделено еще 2 компонента спада эха от протонов. Один из них — промежуточный с $T_2 = 4 \div 5$ мс, амплитуда которого нарастала в ходе набухания в обычной и в тяжелой воде, — был отнесен к воде, постепенно проникающей в клетки эндосперма. У другого, более быстрого компонента спада с $T_2 = 0,4$ мс, амплитуда, наоборот, убывала при набухании семян в тяжелой воде (рис. 28). Значения T_2 для протонов от данного компонента соответствуют воде, исходно находившейся в воздушно-сухих семенах, и они должны были бы возрасти за счет увеличения ее подвижности при смешивании с поступившей извне тяжелой водой. Однако даже через 5 ч после начала набухания, когда по данным радиоактивной метки вода должна заполнить практически весь объем семени пшеницы [349], около трех четвертей воды, связанной крахмалом эндосперма, не изменили свои релаксационные характеристики (рис. 28) [32, 259]. Это показывает, что тяжелая вода и через 5 ч

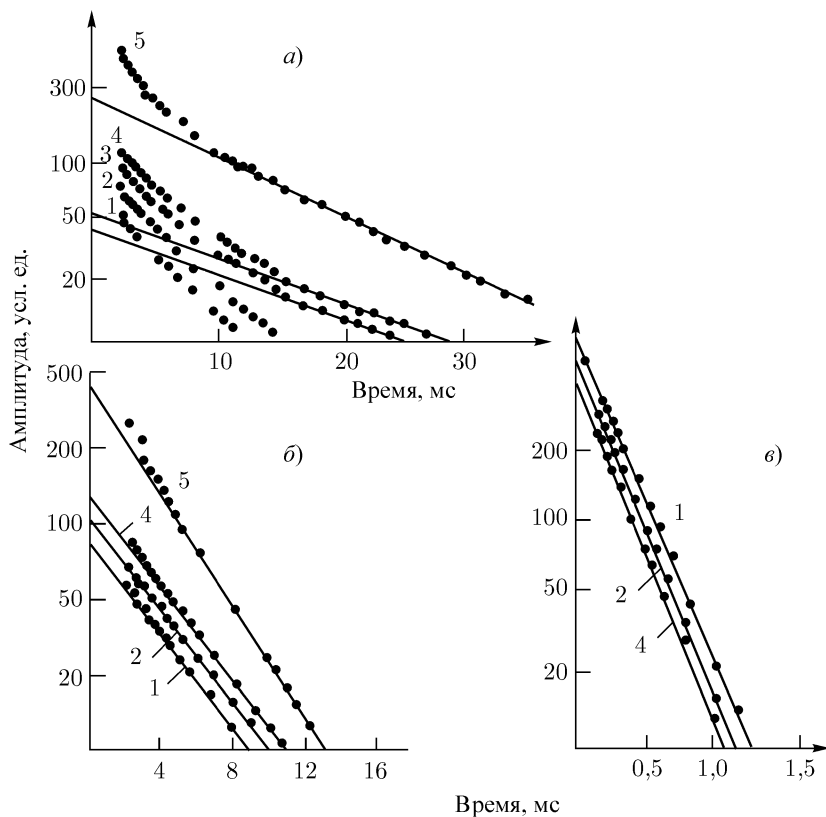


Рис. 28. Кривые спада спинового эха от протонов в семенах пшеницы при различном времени набухания в тяжелой воде (1–4) и после 4 ч набухания в обычной воде (5): а) суммарные кривые спада и выделенные из них медленные компоненты, б) промежуточные компоненты, в) — быстрые компоненты. Время набухания в тяжелой воде: 1 — 1 ч, 2 — 3 ч, 3 — 4 ч, 4 — 5 ч [32]

набухания не успевает проникнуть в клетки в большей части объема воздушно-сухих семян из-за наличия в них определенных препятствий.

Следовательно, результаты исследований с помощью метода спинового эха ЯМР по набуханию семян пшеницы в обычной и в тяжелой воде свидетельствуют о существенно гетерогенном распределении воды на ранних его этапах, о появлении уже в первые часы воды в объем-

ной жидкой фазе и, одновременно, о замедленном проникновении воды в клетки в большей части объема эндосперма.

Указанные данные относятся к кинетике процесса набухания, когда распределение воды заметно отличается от равновесного. Сведения о более близком к равновесному распределении воды были получены после выдерживания набухавших различное время семян в закрытом объеме в течение суток. Это приводило к определенному перераспределению воды в пределах семени и к заметному изменению ее состояния, о чем свидетельствует изменение соотношения между амплитудами медленного и промежуточного компонентов спада спинного эха (рис. 29). Прежде всего, уменьшилось количество воды в жидкой фазе, вплоть до ее исчезновения в семенах, набухавших менее 2–3 ч, хотя общее количество воды в семенах не изменилось. И если появление жидкой воды приводило к резкому росту дыхания семян, то ее исчезновение через сутки для семян, набухавших менее 3 ч, вызывало и заметное падение дыхания, несмотря на ту же общую влажность семян. В то же время сохранение через сутки жидкой воды в случае большего срока набухания приводило к резкому дополнительному подъему дыхания (рис. 30) [32]. В дальнейшем, при увеличении количества воды в семенах еще примерно в 1,5 раза, в основном в жидкой фазе, достигается критический уровень оводненности, необходимый для их прорастания [195].

Таким образом, в семенах пшеницы можно выделить по крайней мере 2 типа клеточных структур, которые заметно отличаются по своему взаимодействию с водой на начальных этапах набухания. В одни из них вода проникает достаточно быстро и, несмотря на общее низкое ее содержание, не только в зародыше, но и в эндосперме на определенном этапе набухания формируется достаточно устойчивая область, содержащая воду в жидкой фазе. Ее формирование сопровождается резкой активацией дыхания. Формирование подобной области, вероятно, сопровождается также процессами восстановления нарушенных при высушивании клеточных мембран в определенной области эндосперма. На наличие таких нарушений указывают известные данные о повышенной утечке ионов, сахаров и других низкомолекулярных веществ в первые часы набухания семян [344]. После восстановления мембран в этих клетках, по-видимому, сохраняется вода в жидкой фазе, участие которой является необходимым условием для пробуждения биологической активности семян. Ее необходимость следует и из данных о невозможности прорастания семян при их увлажнении в парах воды [195, 277].

Следует также отметить, что отдельная жидкая фаза распределена не по всему объему эндосперма и на ряде последующих этапов прорастания семян, на что указывают данные ЭПР томографии для поперечного среза семени пшеницы (рис. 31) [218]. На срезе видно, что водный рас-

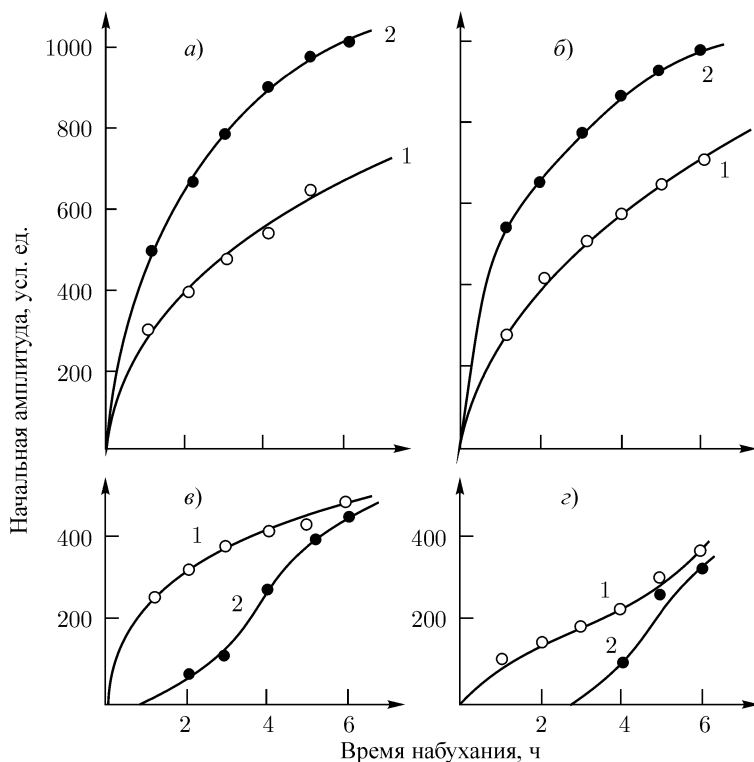


Рис. 29. Изменение амплитуды промежуточного (а, в) и медленного (б, г) компонентов спада спинного эха от протонов в зависимости от времени набухания в обычной воде для целых семян (слева) и для семян, у которых перед измерениями удален зародыш (справа): 1 — сразу после набухания, 2 — через сутки выдерживания в закрытом объеме [32]

твор спинного зонда распределен весьма неравномерно, и в основном он находится в районе центрального сосудистого пучка и в пределах алейронового слоя семени пшеницы. В случае же старых семян с большим числом дефектов вода, по данным ЭПР томографии, занимает существенно больший объем семени [33].

Вместе с тем, в семенах пшеницы существует и другой тип структур, в которые, как показывают приведенные выше данные, вода при набухании проникает сравнительно медленно. Медленный характер про-

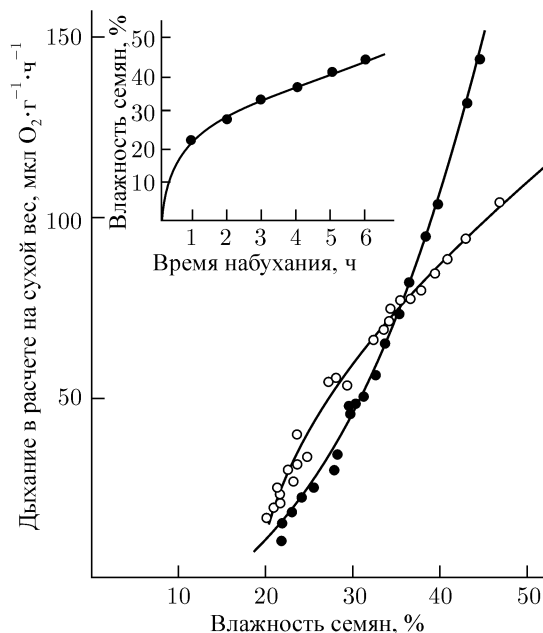


Рис. 30. Интенсивность дыхания семян пшеницы в зависимости от содержания в них воды: 1 — сразу после прекращения набухания; 2 — через сутки выдерживания набухших семян в закрытом объеме [32]

проникновения воды в эти структуры находится, как уже отмечалось, в соответствии с трудностями извлечения из них относительно подвижной воды ($T_2 = 0,4$ мс по сравнению с $T_2 = 0,01$ мс для протонов прочно связанной воды). Подобные результаты можно объяснить за счет низкой проницаемости мембран в клетках крахмалистого эндосперма, возникающей в процессе высушивания семян. Эти выводы были затем подтверждены и детализированы при изучении процессов проникновения воды в клетки семян пшеницы, которые в течение ряда недель выдерживали при различной относительной влажности (ОВ) [55].

Исследование указанных процессов проводили с помощью метода спинного эха ЯМР, в котором для подавления сигнала от протонов внеклеточной воды и для оценки ее обмена с внутриклеточной водой использовали метод «парамагнитного допинга» [61, 291]. Было показано, что проникновение воды в клетки семян пшеницы, находившихся при ОВ

57 часов

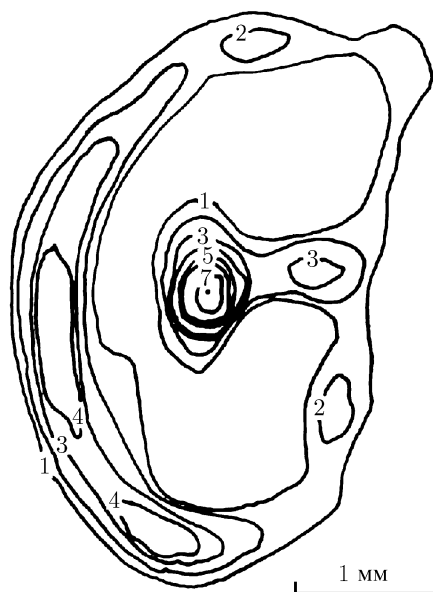


Рис. 31. Двухмерное изображение распределения спинового зонда на поперечном срезе семени пшеницы через 57 ч набухания в водном растворе спинового зонда [218]. Цифры соответствуют концентрации зонда

менее 50 % (29 и 44 %) существенно замедлено по сравнению с семенами, выдержанными при большей ОВ (66 и 76 %). Заметные различия между данными партиями семян были выявлены и при исследовании кинетики прорастания семян пшеницы. При этом появление проростков у семян, выдержанных при ОВ менее 50 %, обычно запаздывало на 6–8 ч по сравнению с семенами, ранее находившимися при большей ОВ [55].

Применение «парамагнитного допинга» позволило также выделить внутри клеток структуры, которые заметно отличаются по степени воздействия обмена с внеклеточной водой на величину T_2 для протонов воды в таких структурах. Сильное влияние обмена очевидно связано с областями, непосредственно граничащими с внеклеточной водой, которая содержит непроникающие в клетку парамагнитные ионы Mn^{++} . В то же время в клетку поступает внеклеточная вода, имеющая, из-за непосредственного влияния на нее парамагнитных ионов, короткие времена

релаксации T_2 . Поступление такой воды в клетку приводит к ускорению релаксационных процессов и к заметному уменьшению значений T_2 также для протонов воды внутри клеток [61, 291]. В данном случае это относится к некоторой части клеточных структур. В то же время для другой части воды наблюдается слабое влияние обмена с водой вне клеток, что указывает на наличие дополнительных препятствий для обмена, возможно, в виде ограниченных мембранами внутриклеточных структур. Кроме того, в данных экспериментах отмечено заметное ускорение обмена воды к концу первых суток набухания из-за увеличения проницаемости мембран на этом этапе, вероятно, за счет активизации работы каких-то каналов внутри мембран [55].

Природа рассмотренных выше явлений очевидно обусловлена различиями эффектов воздействия воды на биологические структуры при низкой и высокой ОВ. В главе 4 отмечалось, что на определенных этапах увлажнения, в том числе при приближении к ОВ = 50%, вода способна внедряться в водородные связи в пределах макромолекул биополимеров и в мембранах. Следующий этап увлажнения связан с появлением воды с высокой диэлектрической постоянной, что, в свою очередь, приводит к появлению латеральной подвижности в пределах мембран [264] (см. главу 4). Подобные процессы, по-видимому, и влияют на восстановление проницаемости клеточных мембран для воды при ОВ более 50%.

Но для восстановления проницаемости вода должна вступить во взаимодействие не только с внешней стороной мембраны, но и проникнуть внутрь клетки через ее неполярную область. Кроме того, необходимо «разморозить» движение в относительно жесткой полярной области на внутренней стороне мембраны, что, в зависимости от особенностей строения мембран и их состава, а также от количества необходимой для этого воды, может потребовать большего или меньшего времени. Необходимо учитывать также, что медленный характер данного процесса делает структуру мембраны чувствительной к резкому изменению ее асимметрии при быстром поступлении воды извне. Такая асимметрия может еще более возрасти при потере остатков воды, сохраняемой внутри клеток в значительной части объема семени. Обычно такая вода сохраняется в клетках за счет того, что она имеет низкую диэлектрическую постоянную и поэтому, несмотря на свою подвижность на молекулярном уровне, практически не влияет на проницаемость мембран. В результате оставшаяся вода не способна выйти из клеток, пока в них не поступит какое-то количество воды извне. Другая возможность выхода воды из клеток в семенах связана с появлением в мембранных структурах дефектов, накопление которых со временем позволяет объяснить наблюдаемую связь между уменьшением влажности воздушно-сухих семян при

их хранении и снижением жизнеспособности семян растений [86]. Вместе с тем, сохранение относительно жесткой и слабо проницаемой при низкой влажности структуры мембран способствует защите внутреннего содержимого клеток не только от потери остаточной воды, играющей какую-то важную роль, но и от неблагоприятных внешних воздействий.

Но те же дефекты в структуре мембран, если они могут быть восстановлены при последующем увлажнении, способны сыграть и положительную роль. Такие дефекты должны содействовать относительно быстрому поступлению воды в клетки в процессе набухания и предохранять структуру мембран от более серьезных нарушений, обусловленных резким изменением их асимметрии из-за быстрого поступления воды извне. С этой точки зрения вполне допустимо, что слабые внешние повреждающие мембрану воздействия могут уменьшить возможные повреждающие эффекты быстрого поступления воды при набухании и стимулировать тем самым процесс прорастания семян.

Таким образом, приведенные выше данные свидетельствуют о существенно гетерогенном характере распределения воды и разным ее состоянием в различных частях семян растений в ходе их набухания и прорастания. В семенах, несмотря на общее низкое содержание воды, уже на ранних этапах набухания появляется вода в объемной жидкой фазе, и именно такая вода играет ключевую роль в активизации метаболических процессов при прорастании семян. При этом объемная жидкая вода локализована лишь в части объема семени, тогда как ее поступление в другую часть объема ограничено мембранными структурами, в разной степени проницаемыми для воды в ходе набухания. Подобное разделение, по-видимому, играет важную роль в определении последовательности включения различных структур в процесс прорастания семян.

6.3. Особенности водного режима семян растений в процессе их созревания

Дополнительные данные о роли воды и ее состояния в биологических процессах были получены при исследовании особенностей водного режима на различных стадиях созревания семян пшеницы с помощью методов спинного эха ЯМР, ЭПР томографии, люминесцентных и других методов.

В ходе созревания семян пшеницы регистрировали следующие показатели: кривые спада спинного эха от протонов воды и общее содержание воды, кинетику их изменения в процессе подсушивания семян при комнатной температуре, пространственное распределение спинного-

го зонда внутри семян сразу после сбора на разных этапах созревания и после их подсушивания [33, 39, 107]. Определяли также фотохимическую активность хлорофилла «а» как показатель состояния мембран в созревающих семенах [85] непосредственно после сбора и спустя сутки или двое после их подсушивания при комнатной температуре и т. д.

Измерения кривых спада спинового эха от протонов воды в семенах пшеницы в ходе их созревания показали, что на первых его стадиях, связанных с увеличением объема семени и содержания в нем воды практически вся вода имеет высокую подвижность, в общем сопоставимую с данными для воды в других частях растения. На этих стадиях происходит и рост содержания воды в расчете на одно семя (рис. 32). Затем отмечается сначала медленное, а начиная с 60 % влажности все более быстрое падение влажности семян пшеницы. При этом по мере созревания семян помимо медленного компонента спада эха от протонов подвижной воды регистрируется и компонент с более быстрым спадом от менее подвижной воды, т. е. распределение воды становится гетерогенным [33]. Данный компонент, в отличие от медленного компонента спада от объемной воды, который быстро уменьшается по мере созревания семян, на этих этапах меняется сравнительно мало, вплоть до достижения влажности семян около 30 %, когда вслед за быстрым исчезновением медленного компонента от подвижной воды происходит постепенное падение и этого компонента (рис. 33). При этом медленный компонент практически полностью исчезает при достижении 20 % влажности семян. Следует отметить также, что процесс водоотдачи оставшейся воды в жидкой фазе заметно ускоряется в ходе подсушивания семян, собранных на более поздних этапах созревания [33, 107, 259].

Существенное влияние на процесс водоотдачи семенами пшеницы в ходе их созревания оказывает состояние клеточных мембран, которое по-разному проявляется на различных стадиях созревания. Одним из показателей состояния мембран служит оцениваемая по замедленной люминесценции фотохимическая активность хлорофилла «а» [85] в семенах пшеницы, которые в свежесобранном состоянии сохраняют зеленый цвет почти до конечного этапа созревания. Как следует из данных рис. 32, подсушивание семян в течение суток приводит к быстрому падению уровня данного вида замедленной люминесценции почти на всех стадиях созревания семян, за исключением стадии молочной или близкой к ней спелости. Семена, собранные на этих стадиях через 21 и 28 дней после цветения, оказались сравнительно устойчивыми к подсушиванию в течение суток, а 21-дневные семена и в течение 2 суток. Затем, по мере созревания, их устойчивость к подсушиванию заметно падает [107].

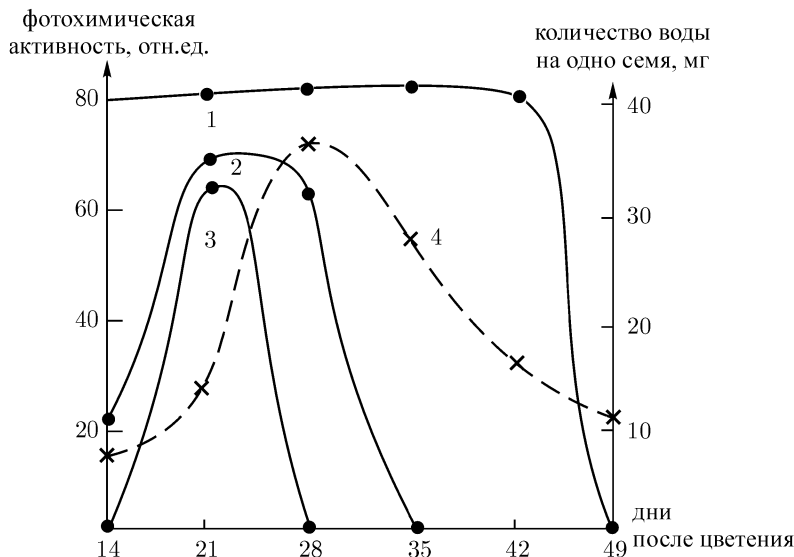


Рис. 32. Изменение фотохимической активности хлорофилла «а» семян пшеницы сорта «Зернофуражная-125» на разных стадиях созревания: 1 — первый день сбора, 2 — через сутки подсушивания на воздухе, 3 — через двое суток, 4 — общее содержание воды на одно семя [107]

Данное явление, как показали наши дальнейшие исследования, имеет важное биологическое значение. Семена на стадиях, более устойчивых к подсушиванию, имеют сравнительно низкую всхожесть, и для них сопротивляемость водоотдаче является жизненно необходимой. Последнее особенно отчетливо проявилось для семян засухоустойчивых сортов пшеницы. Для семян 7 сортов пшеницы, собранных на этих стадиях созревания, было показано, что 4 засухоустойчивых сорта сохраняют в воздушно-сухом состоянии больше влаги по сравнению с тремя изученными незасухоустойчивыми сортами [30]. Подобные различия постепенно исчезают по мере созревания семян пшеницы. Существование различий между семенами устойчивых и неустойчивых к засухе сортов на близкой к молочной стадии созревания было в дальнейшем подтверждено для семян еще 5 сортов пшеницы [55].

Отличие по устойчивости и проницаемости мембран в свежесобранных семенах на различных стадиях созревания было показано также методом ЭПР томографии. Спиновый зонд и через 10 ч поме-

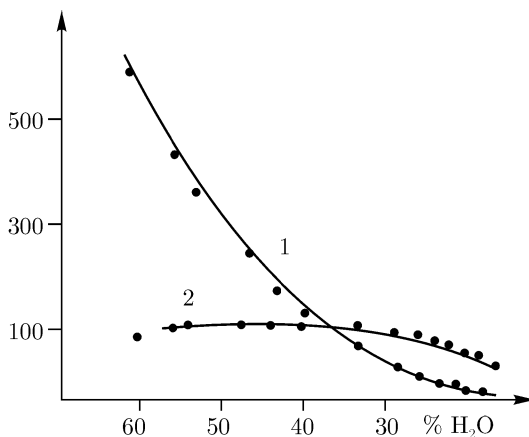


Рис. 33. Изменение амплитуды медленного (1) и быстрого (2) компонентов спада спинового эха от протонов воды в зависимости от остаточной влажности семян пшеницы в ходе их созревания [33]

пения семян в раствор зонда плохо проникал в свежесобравные семена на ранних стадиях созревания. Исключение составила область уже сформированного на этих стадиях зародыша. Затем, по мере созревания, область проникновения зонда постепенно возрастала [107], что, по-видимому, связано с растущей дестабилизацией клеточных мембран в значительной части эндосперма. Последнее хорошо согласуется с рассмотренными выше данными люминесцентного метода по устойчивости к высушиванию свежесобравных семян. Подобная дестабилизация мембран, сопровождаемая быстрой потерей объемной воды, может сыграть важную роль также для процесса удаления вместе с водой излишка солей из клеток, чтобы избежать роста их концентрации по мере высушивания. Увеличение концентрации солей и, соответственно, увеличение ионной силы (см. главу 5) способно вызвать высвобождение белков, связанных на мембранах и на других структурах внутри клеток, и таким образом нарушить их равновесное распределение, необходимое для последующего прорастания. В результате должна снизиться и устойчивость семян к хранению и различным внешним воздействиям. Отсюда следует, что быстрое удаление оставшейся объемной воды вместе с солями должно предотвратить развитие такого рода процессов [18]. Следует напомнить в этой связи, что предотвращение подобных процессов существенно и для низших растений, т. е. оно имеет более общее значение.

В частности, было показано, что устойчивые к высушиванию виды лишайников сохраняют заметно меньшее количество калия по сравнению с неустойчивыми видами [271].

Вместе с тем, завершение процесса высушивания, как показывают данные ЭПР томографии, заметно изменяет условия для проникновения спинового зонда по сравнению со свежесобранными семенами. При этом процесс высушивания по-разному сказывается на распределении спинового зонда в эндосперме семян пшеницы, собранных на различных стадиях созревания. Области, мало доступные для зонда на ранних этапах созревания в свежесобранных семенах, становятся, наоборот, доступными после высушивания семян, тогда как на более поздних стадиях имеет место противоположный процесс. Данные рис. 34 и 35 свидетельствуют о постепенном уменьшении в высушенных семенах, по мере их созревания, объема, доступного для водного раствора зонда, что в общем совпадает с уменьшением доли воды в жидкой фазе, регистрируемой методом спинового эха ЯМР. Сокращение объема, доступного для спинового зонда в высушенных семенах в процессе созревания сопровождается и уменьшением выхода электролитов из семян. Следовательно, по мере созревания семян происходит не просто уменьшение влажности семян, а уменьшается объем жидкой фазы в пределах семян. Интересно также отметить, что в семенах, собранных после сильного дождя (рис. 35), несмотря на более позднюю стадию созревания, водный раствор спинового зонда становится способным проникнуть в большую часть объема эндосперма, что, вероятно, обусловлено нарушением структуры мембран в некоторой части этого объема из-за повторного увлажнения и дополнительного высушивания уже созревших семян.

Следовательно, исследование особенностей водного режима в процессе созревания семян пшеницы методами спинового эха ЯМР, ЭПР томографии и других позволяет прийти к выводу о существенно гетерогенном распределении воды в созревающих семенах. Существенную роль в этих процессах играют мембранные структуры, состояние которых значительно изменяется как по ходу созревания, так и по степени влияния на них процессов высушивания. Мембранные структуры, наряду с процессами отложения запасных веществ, заметно влияют на постепенное сокращение объема жидкой водной фазы в пределах семени по мере его созревания. Связь между наличием жидкой фазы и активацией дыхания в ходе набухания семян позволяет предположить, что именно с этой фазой связаны активные биологические процессы и в ходе созревания семян. Жидкая фаза, как уже отмечалось, необходима для активного управления клеточными процессами за счет переходов белков из связанного состояния в воду и обратно. Это подтверждается данными не только для семян высушенных растений, но и, косвенно, данны-

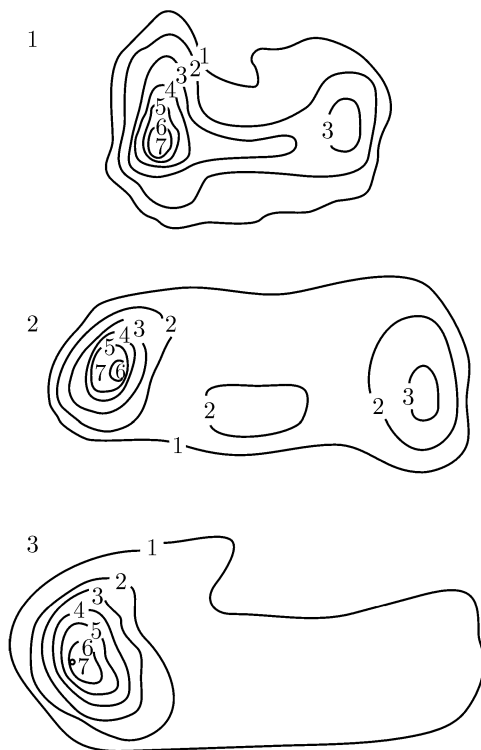


Рис. 34. Двухмерное изображение распределения спинового зонда в семенах пшеницы сорта «Зернофуражная-125», собранных и высушенных на разных стадиях созревания: 1 — через 14 дней после цветения, 2 — через 19 дней, 3 — через 27 дней. Время фиксации семян в растворе зонда 3 ч. Цифры на рисунке соответствуют концентрации зонда по отношению к его концентрации в зародыше, принятой за 7 единиц [38]

ми о необходимости удаления избыточного калия по мере высушивания низших растений — лишайников для сохранения ими жизнеспособности при переходе в неактивное высушенное состояние [271]. Значение жидкой водной фазы и ее состояния в клетках следует и из цитированных выше многочисленных результатов по зависимости метаболизма от состояния воды в организмах и об их чувствительности к потере даже относительно небольшой ее части.

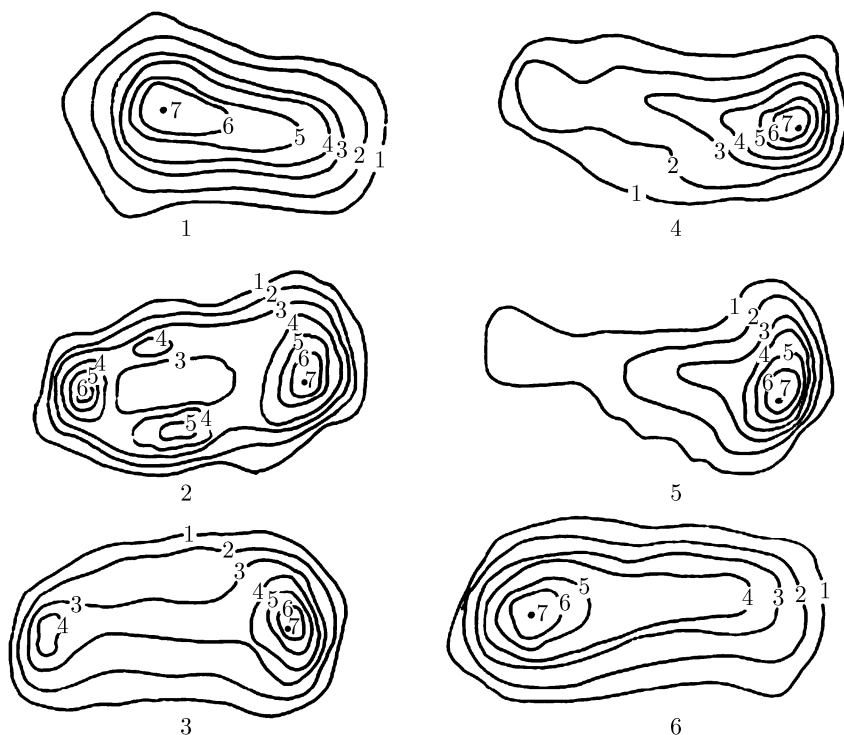


Рис. 35. Двухмерное изображение распределения спинового зонда в семенах пшеницы сорта «Зернофуражная-125», собранных и высушенных на разных стадиях созревания: 1 — через 14 дней после цветения, 2 — через 19 дней, 3 — через 27 дней, 4 — через 32 дня, 5 — через 36 дней, 6 — через 39 дней (после дождя). Время фиксации семян в растворе зонда 10 ч. Цифры на рисунке соответствуют концентрации зонда по отношению к его концентрации в зародыше, принятой за 7 единиц [107]

Таким образом, имеющиеся данные по особенностям водного режима семян растений в ходе их созревания и прорастания не противоречат представлениям о необходимости наличия объемной водной фазы в клетках для активного управления метаболическими процессами.

ГЛАВА 7

Эффекты и механизмы чувствительности метаболических процессов к слабым воздействиям (на примере чувствительности к ЭМП низких частот)

7.1. Введение

Приведенные в предыдущих главах данные о регуляторной роли воды в биологических процессах создают основу для рассмотрения широкого круга вопросов, относящихся к влиянию на организмы разнообразных слабых и сверхслабых воздействий и к выяснению их возможных механизмов. Известно, что метаболические процессы в клетке чувствительны к воздействию слабых неспецифических факторов, в том числе таких, которые прямо не взаимодействуют с рецепторами или с другими специализированными структурами. Это существенно затрудняет поиск возможных физико-химических механизмов их влияния на клеточный метаболизм. Еще большие трудности возникают при изучении эффектов не локализованных, а распределенных по объему клетки слабых воздействий, которые в каждой отдельной точке имеют энергию на несколько порядков меньше тепловой энергии kT , но, тем не менее, играют какую-то роль в биологических процессах и даже могут влиять на общее состояние организма.

К таким слабым воздействиям относятся, в частности, электромагнитные поля (ЭМП), биологическим эффектам которых посвящена обширная литература [71, 72, 99, 192, 241, 242, 276, 279, 358]. Однако несмотря на большое число данных об активном воздействии слабых ЭМП на биологические процессы, данная проблема, если исключить спиновые эффекты [71, 82], во многом остается дискуссионной. Это связано, прежде всего, с отсутствием реальных физико-химических механизмов, которые могли бы объяснить как чувствительность клетки

к столь слабым по энергии воздействиям, так и необычный характер наблюдаемых под влиянием ЭМП зависимостей. Особенно много вопросов вызывают биологические эффекты ЭМП низких и сверхнизких частот. В результате даже складывается мнение что, по заключению ведущего американского физического журнала *Physical Review A* ((1991) Vol. 43, P. 1039), «... *любые биологические эффекты слабых низкочастотных полей на клеточном уровне должны находиться вне рамок традиционной физики...*» (цит. по [71]).

Подобные сомнения обусловлены не только практическим отсутствием в литературе сведений о возможных путях преобразования в клетке весьма низкой энергии таких полей в биологически значимый ответ. Например, в случае эффектов магнитных бурь на Солнце энергия $E = h\nu$ на 14 порядков меньше kT , а напряженность создаваемого ими электрического поля на 6–7 порядков ниже ее значения на мембранах. Отмечают также отсутствие прямой связи между энергией воздействия и наблюдаемым биологическим эффектом, включая даже его уменьшение при росте амплитуды ЭМП [192, 276, 279]. Вызывает вопросы и разноречивость приводимых в литературе результатов экспериментов, когда по данным одних авторов ЭМП-воздействие стимулирует развитие патологических процессов, тогда как другие авторы используют ЭМП для лечения таких же заболеваний [71, 276, 279]. Ряд вопросов относится и к наличию определенной корреляции между геомагнитной активностью и проявлениями различных болезней [92, 242], так как здесь нельзя исключить, что подобная связь имеет не прямой, а опосредованный характер. В еще большей степени это относится к связи такой активности с явлениями социального характера [241, 242]. Последние результаты действительно трудно представить в рамках представлений традиционной физики.

И тем не менее, анализ полученных ранее данных и результаты выполненных нами экспериментов приводят к выводу, что наблюдаемые необычные закономерности не противоречат представлениям традиционной физики. Рассматриваемый далее физико-химический механизм воздействия ЭМП низких и сверхнизких частот на биологические процессы позволяет подойти к объяснению основных характеристик отмеченных выше явлений, не выходя за рамки физико-химических представлений. Поскольку результаты исследований в указанной области часто подвергаются критике из-за недостаточно строгого их экспериментального обоснования, остановимся на полученных нами данных более подробно. Здесь следует отметить, что изучение эффектов ЭМП может служить также проверкой предложенного в главе 5 физико-химического механизма регуляции метаболических процессов на клеточном уровне.

7.2. Постановка задачи

Вопрос о механизмах нетеплового воздействия электромагнитных полей низких и сверхнизких частот на различные процессы в организмах занимает важное место в общей проблеме взаимодействия ЭМП с живыми системами. Его актуальность определяется также тем, что к этой области относятся частоты ЭМП в линиях электропередачи, в различных промышленных установках и в бытовых приборах, а также частоты геомагнитных и космофизических флуктуаций, под воздействием которых находится особенно широкий круг биологических объектов. К той же области частот относятся поля, которые регистрируют в качестве предвестников землетрясений, и возможно, что именно на них реагируют отдельные виды животных. В том же диапазоне находятся частоты модуляции, заметно усиливающей эффекты ЭМП высоких частот [182, 192, 272, 276, 279, 358]. Здесь еще раз следует отметить, что с влиянием ЭМП сверхнизких частот, возникающих при магнитных бурях на Солнце, связывают не только различные биологические эффекты, но и ряд явлений социального характера [241, 242].

Однако при наличии обширного числа данных по биологическим эффектам ЭМП сверхнизкой частоты их интерпретация и даже сами полученные результаты продолжают оставаться дискуссионными. Как отмечалось выше, это обусловлено практическим отсутствием в литературе данных о механизмах преобразования в клетке весьма низкой энергии ЭМП. Такие механизмы должны объяснить не только саму возможность получения биологически значимого ответа на столь слабое воздействие ЭМП, но и отмеченный выше необычный характер регистрируемых в данных случаях зависимостей. В частности, это относится к наблюдению ряда биологических эффектов в периоды геомагнитных и космофизических флуктуаций («магнитных бурь») [92, 99, 168, 242], тогда как большие по энергии воздействия не приводят к таким результатам. Подобные необычные зависимости вообще характерны для эффектов ЭМП в организмах с отсутствием у них пропорциональной зависимости от величины поля, наличием максимальных эффектов при некоторых значениях поля и даже ростом биологических эффектов при уменьшении его амплитуды и частоты [72, 192, 276, 279, 358]. Решение данного парадокса, учитывая особенно низкую энергию воздействия ЭМП сверхнизкой частоты на каждую из отдельных биологических структур, имело бы принципиальное значение для всей проблемы взаимодействия ЭМП с живыми системами.

Для объяснения подобной зависимости эффектов ЭМП в организмах необходимо, с одной стороны, чтобы в клетке существовали механизмы, обеспечивающие усиление столь слабых воздействий за счет раз-

личных нелинейных процессов, а также их локализацию вблизи клеточных структур с высокой чувствительностью к таким эффектам. С другой стороны, в клетке должны происходить процессы, которые могли бы ограничить или ослабить воздействие ЭМП при росте его амплитуды (здесь речь не идет о тепловых эффектах). Эти задачи не были решены в моделях, связывающих эффекты ЭМП в организмах с их воздействием на некоторые характеристики мембран [322, 325]. Нельзя не учитывать, что напряженность электрических полей ($E = 1 \div 10$ В/м), создаваемых при геомагнитных флуктуациях, на 6–7 порядков меньше напряженности поля на мембране и существенно меньше уровня мембранных шумов.

Принципиально другие возможности возникают при рассмотрении вызванных переменным ЭМП нестационарных процессов в клетке и в примембранном слое, которые будут происходить в случае, когда ионы под действием ЭДС, наводимой этим полем внутри клетки, проходят за его период лишь часть расстояния между клеточными мембранами [26, 27, 257]. Такие условия, в частности, соблюдаются для полей и частот геомагнитных флуктуаций. Исходя из данных для подвижности ионов K^+ в воде при $18^\circ C$ $v = 64$ См·см/г·эв [329] имеем, что при обычных для таких флуктуаций частотах $f = 0,1$ Гц и ниже и напряженности поля $E = 1\text{--}10$ В/м ионы K^+ проходят за период ЭМП под его воздействием порядка 1 мкм, что меньше размера клетки, но сопоставимо с ним. В случае промышленных частот такое же расстояние за период ЭМП ионы проходят при значениях напряженности поля E на 3 порядка более высоких, и именно здесь наблюдают различные биологические эффекты [276, 279].

При соблюдении указанных выше условий периодическое движение ионов в неоднородной среде клетки должно приводить к различным нелинейным эффектам и к появлению градиента концентрации ионов в примембранном слое, чему способствует повышенная вязкость данного слоя и наличие в нем дополнительных зарядовых взаимодействий. Возможность нелинейных эффектов ЭМП на уровне клетки следует, например, из данных математического моделирования [186, 187, 205, 206, 340]. В частности, за счет трансмембранного селективного обмена ионов (с учетом резких различий концентрации ионов Na^+ , K^+ и Ca^{++} по разные стороны мембраны) может измениться и величина pH в этом слое, причем подобные эффекты относятся именно к случаю слабых ЭМП сверхнизких частот [206, 340]. В свою очередь, изменения в примембранном слое должны влиять на переходы слабосвязанных периферических белков в воду или обратно. Данный процесс, как отмечалось в главе 5, связан с малым изменением свободной энергии [13, 16]. Более длительное воздействие за период ЭМП сверхнизких частот по сравнению с высокими частотами позволяет рассчитывать и на появление

за этот период достаточно больших тепловых флуктуаций, необходимых для преодоления активационного барьера для таких переходов.

В то же время при воздействии более сильных внешних ЭМП ионы успевают преодолеть все расстояние между мембранами. Этот случай должен приводить к стационарному распределению индуцируемых извне напряжений, в соответствии с сопротивлением участков цепи. Тогда практически все такое напряжение будет падать на мембране, где оно составит лишь малую долю от уровня мембранных шумов. В другом же варианте — нестационарного случая слабых полей — напряжение, индуцируемое внешним полем, распределяется по объему клетки, и там его относительная доля значительно выше, чем на мембране, причем здесь важную роль играет также более высокая проводимость растворов ионов внутри клетки по сравнению с мембраной. Это должно приводить и к более заметному влиянию даже слабых полей на ионный ток [26, 27, 257].

Таким образом, учет нестационарных процессов, связанных с движением ионов в межмембранном пространстве в принципе позволяет подойти к выявлению механизмов, определяющих необычный характер зависимости биологических эффектов от амплитуды ЭМП. При этом появление таких эффектов будет зависеть не от амплитуды, а от отношения амплитуды к частоте ЭМП, когда сверхнизким частотам соответствуют и очень малые амплитуды полей. В качестве же факторов, особенно чувствительных к воздействию ЭМП сверхнизких частот могут служить переходы белков из связанного в свободное состояние и обратно, а также изменение рН в клетке после такой обработки. Возможны и какие-то иные эффекты. Указанные предположения были проверены экспериментально.

При постановке экспериментов учитывали, что их результаты существенно зависят от выбора объекта для исследования. Величина ожидаемого эффекта может быть связана с состоянием организма, которое не всегда удается контролировать, в клетках параллельно проходит множество других процессов, которые могут реагировать на ЭМП в разных направлениях, возможны другие, не всегда учитываемые слабые воздействия и т. д., что будет приводить к снижению воспроизводимости результатов и их достоверности.

Исходя из указанных соображений, для изучения эффектов ЭМП сверхнизких частот были выбраны семена пшеницы в ходе их набухания и начальных этапов прорастания. Выбор семян обусловлен тем, что их переход от состояния покоя к прорастанию на первых стадиях проходит в одном направлении — к высвобождению различных структур из связанного состояния, причем существует определенная последовательность процессов — сначала идет формирование корней и лишь затем образуются проростки [277]. Поэтому, подбирая время воздействия ЭМП

на них, можно, в принципе, избирательно влиять на те или другие реакции. В свою очередь, различная чувствительность к ЭМП у разных процессов в ходе прорастания семян позволяет проводить дифференциальные измерения, что повышает надежность регистрации именно эффектов ЭМП. Надежность регистрации повышается и за счет измерения нескольких показателей, которые могут быть сопоставлены между собой и данными контроля. Такими показателями являются изменение pH вблизи поверхности зародыша семян и в окружающем объеме, гидролитическая активность ферментов эстераз, высвобождаемых в ходе набухания семян, и кинетика выхода продуктов их реакции, а также число семян с проростками и с корнями, длины проростков и другие, более косвенные биологические характеристики. Данные показатели измеряли после ЭМП-обработки на разных этапах набухания и прорастания семян и в контроле для семян нескольких сортов пшеницы, отличающихся по своей всхожести. Изучали также влияние осмотического давления в среде на наблюдаемые эффекты ЭМП-воздействия [41].

ЭМП-обработку проводили на магнитной мешалке ММ-5 или с помощью аппарата для низкочастотной магнитотерапии МАГ-30-3 на частотах 30–50 Гц в течение 7–15 мин в разных экспериментах или же, при изучении эффектов длительного воздействия, в течение всего срока набухания или его отдельных этапов. Значение амплитуды переменного магнитного поля H в разных опытах составляло от 10 до 30 мТ. Условия экспериментов более подробно описаны в соответствующих статьях [26, 27, 257].

7.3. Влияние ЭМП-обработки на активацию эстераз

Активность ферментов эстераз в ходе набухания семян пшеницы, по нашим предположениям, должна проявляться спустя несколько часов после начала набухания, когда в клетках будет достигнута достаточно высокая оводненность. В этом случае ферменты могут перейти из связанного на мембранах состояния в воду с соответствующим ростом их активности. Тогда же можно ожидать и повышения чувствительности данного процесса к ЭМП-обработке.

Такая картина действительно имеет место для семян сорта «Заря» с всхожестью 95 % (рис. 36 а). Здесь каждая точка на кривых рис. 36 является результатом отдельного эксперимента. Измерения выхода в среду продуктов гидролиза эстеразами нефлуоресцирующего соединения флуоресцеиндиацетата (ФДА) в флуоресцеин (ФЛ) показали, что в начале процесса набухания (до $6 \div 8$ ч) происходят сравнительно малые его изменения. Затем отмечено резкое увеличение выхода ФЛ в водную среду

с максимумом между 15 и 18 ч набухания и последующим спадом до примерно исходного уровня. При этом различия в активности эстераз на разных стадиях набухания приводят и к различиям по чувствительности данной реакции к ЭМП-обработке. Наибольшие эффекты ЭМП у семян с высокой всхожестью зарегистрированы именно на стадии возрастания активности эстераз и вблизи ее максимума, где эффект достигал двух раз и более при заметном разбросе данных в различных опытах. После 11 ч набухания сильная реакция на ЭМП-обработку была отмечена во всех опытах, а начиная с 17–18 ч, когда отмечен спад активности, ЭМП уже слабо влияло на выход продуктов гидролиза (рис. 36а).

В семенах пшеницы сорта «Заря» с всхожестью 20 % наблюдали иную картину (рис. 36б). Здесь после высокой начальной скорости процесса гидролиза, связанного, вероятно, с выходом ферментов и продуктов их реакции из поврежденных клеток, потом происходит ее спад. Затем отмечается нарастание активности и, — как в образцах семян с высокой всхожестью, но на 10–12 ч позднее — достигается максимум выхода продуктов гидролиза. При этом сами ферменты, по-видимому, не выходят из семян, что следует из измерения их активности при добавлении ФДА в водную среду после удаления из нее набухших семян. В семенах с низкой всхожестью ЭМП-обработка либо не меняла, либо даже уменьшала выход ФЛ в среду (рис. 36б).

Для получения дополнительных сведений о природе и особенностях процесса активации эстераз были выполнены сравнительные измерения эффектов обработки ЭМП при расположении образца семян пшеницы сорта «Инна» непосредственно на поверхности магнитной мешалки и в подвешенном на нити состоянии, чтобы исключить эффекты вибрации. Определяли также зависимость выхода продуктов гидролиза ФДА от времени обработки и, кроме того, кинетику выхода ФЛ на разных стадиях набухания.

В семенах пшеницы сорта «Инна» с всхожестью 80 %, т. е. со средним ее значением по сравнению с двумя видами семян сорта «Заря», положительные эффекты ЭМП-обработки на выход продуктов гидролиза ФДА наблюдали в более широком интервале времен набухания, вплоть до 24 часов и выше. В этом интервале и были выполнены сравнительные измерения. Данные 28 опытов при расположении образца набухающих семян непосредственно на поверхности мешалки и в подвешенном вблизи нее состоянии показали, что эффект подвески составляет $0,64 \pm 0,03$ от суммарного эффекта. Данные других 26 опытов при подвеске образца на расстоянии 1 см и 2 см от этой поверхности составили, соответственно, $0,68 \pm 0,05$ и $0,58 \pm 0,05$ от полного эффекта ЭМП-обработки. Такое ослабление может быть частично связано с уменьшением амплитуды ЭМП. Но вибрация также дает некоторый вклад. Для дополнительной

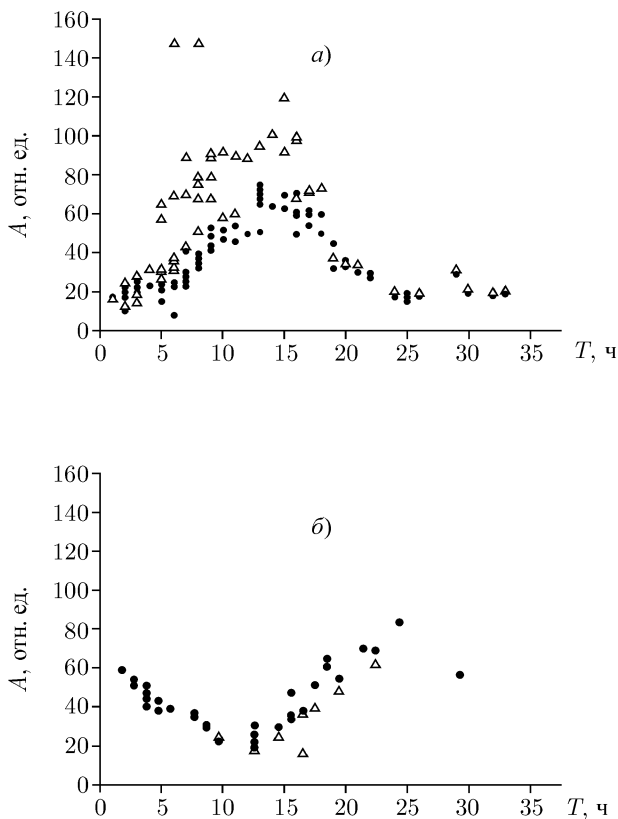


Рис. 36. Выход ФЛ из семян пшеницы сорта «Заря» с высокой (а) и низкой (б) всхожестью на разных стадиях их набухания в контроле (●) и после 7 мин воздействия низкочастотного ЭМП (Δ)

оценки эффектов вибрации вращающийся магнит был заменен на близкий по форме латунный диск, и здесь в 19 проведенных опытах было получено $0,31 \pm 0,05$ от величины общего эффекта.

Следовательно, основной наблюдаемый эффект активации эстераз (по крайней мере, около 2/3 от величины общего эффекта) обусловлен воздействием переменного ЭМП. Некоторый эффект дает и вибрация, хотя в последнем случае какой-то вклад в него может вносить поле, создаваемое вращающимся электромотором.

Основная роль эффектов переменного ЭМП была подтверждена и в опытах по исследованию кинетики выхода продуктов гидролиза ФДА из семян при разных временах их набухания в случаях помещения образца на подвеске или на поверхности мешалки. Измеряли также зависимость выхода ФЛ от длительности ЭМП обработки. Обработка в течение 7 или 15 мин практически не влияла на полученные результаты. При этом более полные измерения кинетики были выполнены для 15 мин. Они и показаны на рис. 37, где каждая группа кривых соответствует различным часам набухания семян. Данные по кинетике выхода ФЛ в разных опытах сравнивали со значениями его выхода в контроле, измеренными через 50 мин после окончания отмывки семян от вышедших ранее продуктов гидролиза. Указанные значения были приняты за начало координат. Другие точки на кривых измеряли через 1 ч и через 2 ч, и они соответствуют разности между этой величиной и измеренными значениями выхода ФЛ в контроле и в опытах с воздействием одного поля или поля вместе с вибрацией.

Сравнение данных ЭМП обработки на поверхности мешалки и на подвеске показало, что при определенных количественных различиях характер кинетики выхода ФЛ для семян с всхожестью 80 % практически одинаков в обоих случаях обработки. В то же время он качественно отличается от кинетики выхода в контроле (рис. 37). В контроле при всех временах набухания (от 4 до 30 ч) кинетика выхода ФЛ имеет линейный характер. Отмечено также нарастание общего выхода ФЛ с достижением его максимума к концу первых суток набухания, т.е. при промежуточных временах по сравнению с семенами 95- и 20 процентной всхожести. Однако в обоих вариантах опытов с ЭМП обработкой линейная кинетика выявлена лишь в течение первых 12–13 ч набухания, а в последующие часы ее характер качественно изменяется. Различия выхода ФЛ между опытом и контролем в первых по времени измерениях нарастают, но затем в обоих вариантах опытов происходит замедление выхода ФЛ вплоть до того, что через 2 ч он становится ниже, чем в контроле. Характер такого замедления практически одинаков как при воздействии одного лишь поля, так и ЭМП вместе с вибрацией. Эти данные, наряду с наличием не только количественных, но и качественных различий опытных кривых по сравнению с контролем, служат еще одним доводом в пользу реальности наблюдаемых эффектов ЭМП, где решающую роль, по-видимому, играет наводимая этим полем ЭДС внутри клеток. Само же замедление выхода ФЛ показывает, что на измеряемый эффект на поздних стадиях набухания, вероятно, влияет также состояние мембранных структур, которое, в свою очередь, изменяется под воздействием ЭМП-обработки. На это косвенно указывает и отсутствие на обработанных ЭМП старых семенах плесени, которая обычно развивается на продуктах утечки из

таких семян после нескольких суток набухания. Эффект залечивания повреждений в мембранных структурах семян подтверждается также заметным увеличением всхожести и скорости прорастания семян [26].

Следовательно, обработка семян пшеницы ЭМП сверхнизкой частоты на стадии набухания, соответствующей активации ферментов эстераз, приводит к отчетливо выраженному увеличению скорости выхода ФЛ при заметно меньшем влиянии поля на более ранних стадиях и ослаблении эффектов на последующих стадиях. Время проявления эффекта зависит от состояния семян и от их всхожести, а также от состояния мембранных структур, на которое, в свою очередь, по-видимому, влияет и ЭМП-обработка. Указанные данные находятся в соответствии с предложенным механизмом воздействия ЭМП сверхнизкой частоты — его влиянием на высвобождение слабосвязанных белков с их активацией в водной среде.

7.4. Влияние ЭМП обработки на изменение рН у зародыша семян пшеницы

Дополнительные сведения о механизмах воздействия ЭМП сверхнизкой частоты дают измерения рН у поверхности зародыша семян пшеницы. На определенной стадии их набухания, помимо высвобождения связанных белков, вблизи зародыша происходят изменения рН. Они обусловлены откачкой протонов из окружающего объема, что служит для закисления внутренней среды в семенах как необходимого этапа их прорастания [189, 277]. Измерение рН в наших экспериментах проводили при расположении торца микроэлектрода в непосредственной близости (5–10 мкм) от поверхности зародыша, но вне семени [339], что исключает какое-либо его влияние на изучаемые процессы.

Эксперименты, выполненные на отдельных семенах пшеницы сорта «Заря» с всхожестью 95 % в течение всего этапа набухания, показывают, что в первые часы набухания происходит некоторое падение рН, по-видимому, связанное с утечкой солей из семян, а затем медленное и примерно через сутки резкое нарастание значений рН вблизи зародыша (рис. 38). Начало такого нарастания рН у разных семян имеет заметный разброс и меняется в пределах нескольких часов.

Данный процесс оказался достаточно чувствительным к 10 мин ЭМП-обработке на магнитной мешалке в ходе набухания семян. Но при этом реакция разных семян из-за их неоднородности оказалась весьма различной, и на ранних стадиях набухания лишь в некоторых опытах был выявлен эффект значительного ускорения изменений рН, которое происходило спустя несколько часов после ЭМП-обработки (рис. 38).

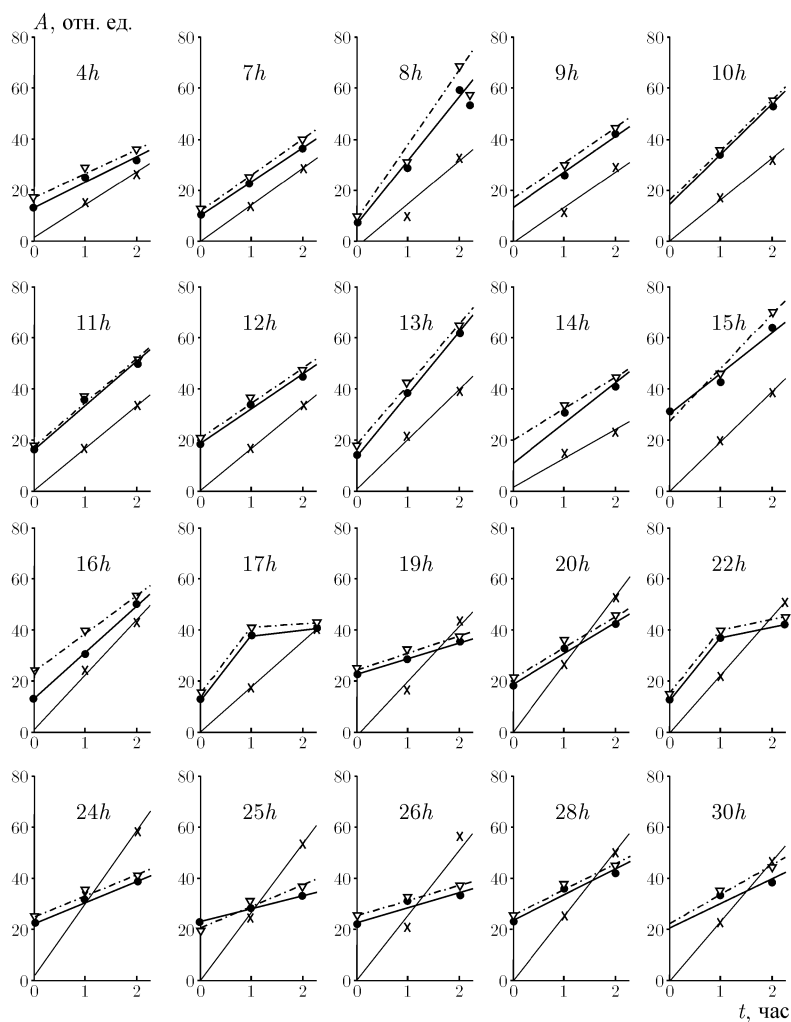


Рис. 37. Кинетика выхода ФЛ из семян пшеницы сорта «Инна» на разных стадиях их набухания в контроле (x) и после 15 мин ЭМП-обработки при нахождении образца на поверхности магнитной мешалки (V) и на подвеске (•), начиная с 50 мин после отмывки семян. Выход ФЛ измерен в относительных единицах. За нуль принято значение выхода ФЛ, измеренное через 50 мин после отмывки. Время набухания показано на диаграммах

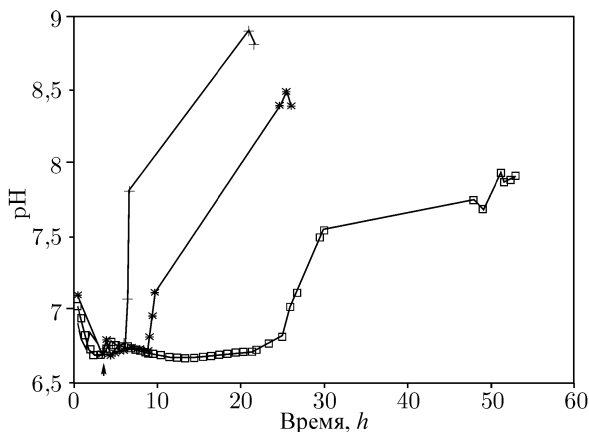


Рис. 38. Кинетика изменения pH вблизи поверхности зародыша семян пшеницы сорта «Заря» с высокой всхожестью в ходе их набухания в контроле (□) и после 10 мин обработки полем магнитной мешалки в двух опытах (+) и (*). Момент воздействия показан стрелкой

Поэтому для получения более полной информации о влиянии ЭМП обработки на величину pH и получения статистически достоверного результата дальнейшие эксперименты выполняли не на отдельных семенах в течение всего срока набухания, а для партий из нескольких десятков семян пшеницы сорта «Инна» с всхожестью 80 %. Эти семена набухали в одном объеме и были разделены на 2 равные части непосредственно перед ЭМП-обработкой. В таблице 1 даны сводные результаты измерений локальных (у каждого семени образца) и объемных значений pH после 10 мин ЭМП-обработки семян на различных стадиях набухания для опытных и контрольных образцов семян. Даны абсолютные значения pH объемного и pH локального в контроле и в опытах, разности между ними ΔpH в опытах и в контроле, а в трех последних столбцах разности значений ΔpH в объеме и у поверхности зародыша, вызванной ЭМП-обработкой и, наконец, их разности $\Delta(\Delta pH)$. Среднеквадратичную ошибку рассчитывали отдельно для абсолютных значений pH и для разности объемных и локальных значений pH.

Из таблицы 1 следует, что в первые часы набухания происходит закисление водной среды за счет утечки из семян солей и других веществ. Не отмечен и эффект ЭМП-обработки. Но уже через 13 и 14 ч набухания в контроле и в опыте наблюдается некоторый рост

Таблица 1. Изменение рН у поверхности зародыша и в объеме в ходе набухания семян пшеницы

Время ЭМП- обработки (ч)	Время измер. (ч)	Число семян	рН объемное контроль/эксперим.	рН локальное контроль/эксперим.	Δ рН локал.-объем. контроль/эксперим.	Эффект (эксп.-контр.) Δ рН объем. Δ рН локал. Δ (Δ рН)
5	8	10 (контр) 10 (эксп)	7, 40 $\pm$ 0, 08 7, 54 $\pm$ 0, 08	7, 15 $\pm$ 0, 04 7, 18 $\pm$ 0, 06	-0, 25 $\pm$ 0, 06 -0, 35 $\pm$ 0, 14	-0, 14 $\pm$ 0, 12 0, 03 $\pm$ 0, 07
	9	10 (к)	6, 93 $\pm$ 0, 08	7, 04 $\pm$ 0, 03	0, 11 $\pm$ 0, 02	0, 12 $\pm$ 0, 07
	14	10 (эксп)	7, 02 $\pm$ 0, 02	7, 16 $\pm$ 0, 06	0, 20 $\pm$ 0, 07	0, 09 $\pm$ 0, 05
	16	10 (к) 5 max	6, 88 $\pm$ 0, 05 7, 00 $\pm$ 0, 02	7, 08 $\pm$ 0, 03 7, 28 $\pm$ 0, 05	0, 36 $\pm$ 0, 10	0, 08 $\pm$ 0, 04
	17	9 (эксп) 5 max	6, 94 $\pm$ 0, 02 6, 99 $\pm$ 0, 02	7, 35 $\pm$ 0, 06 7, 43 $\pm$ 0, 05	0, 41 $\pm$ 0, 05 0, 50 $\pm$ 0, 04	0, 17 $\pm$ 0, 08 0, 12 $\pm$ 0, 08
12	18	9 (эксп) 5 max	7, 03 $\pm$ 0, 03 7, 09 $\pm$ 0, 04	7, 51 $\pm$ 0, 07 7, 63 $\pm$ 0, 10	0, 48 $\pm$ 0, 06 0, 59 $\pm$ 0, 06	0, 22 $\pm$ 0, 09 0, 18 $\pm$ 0, 08
	19	10 (к) 5 max	7, 06 $\pm$ 0, 03 7, 16 $\pm$ 0, 02	7, 39 $\pm$ 0, 06 7, 53 $\pm$ 0, 05	0, 34 $\pm$ 0, 05 0, 42 $\pm$ 0, 04	0, 13 $\pm$ 0, 12 0, 19 $\pm$ 0, 08
	19	5 (к)			0, 23 $\pm$ 0, 03	-0, 07 $\pm$ 0, 15
	20	10 (эксп)			0, 32 $\pm$ 0, 09	
	21	5 (к)			0, 62 $\pm$ 0, 04	
17	22	10 (к) 8 max 6 max			0, 63 $\pm$ 0, 05 0, 68 $\pm$ 0, 06	
	17	10 (эксп) 8 max 6 max			0, 67 $\pm$ 0, 12 0, 78 $\pm$ 0, 11 0, 92 $\pm$ 0, 06	0, 05 $\pm$ 0, 13 0, 15 $\pm$ 0, 12 0, 24 $\pm$ 0, 08
	18	8 max			0, 40 $\pm$ 0, 05	
	22	5 (к) 3 max	7, 00 $\pm$ 0, 02 7, 02 $\pm$ 0, 02	7, 41 $\pm$ 0, 05 7, 47 $\pm$ 0, 06	0, 45 $\pm$ 0, 06	0, 05 $\pm$ 0, 08
	23	9 (эксп) 6 max	7, 22 $\pm$ 0, 02 7, 25 $\pm$ 0, 02	7, 95 $\pm$ 0, 12 8, 12 $\pm$ 0, 07	0, 68 $\pm$ 0, 11 0, 87 $\pm$ 0, 08	0, 30 $\pm$ 0, 18 0, 42 $\pm$ 0, 10
20	24	5 (к) 3 max	7, 34 7, 34	7, 88 $\pm$ 0, 04 7, 93 $\pm$ 0, 04	0, 55 $\pm$ 0, 05 0, 59 $\pm$ 0, 07	0, 07 $\pm$ 0, 03
		10 (к) 6 max	7, 17 $\pm$ 0, 02 7, 18 $\pm$ 0, 02	7, 65 $\pm$ 0, 05 7, 70 $\pm$ 0, 06	0, 48 $\pm$ 0, 07 0, 52 $\pm$ 0, 07	0, 20 $\pm$ 0, 12
	22,5	5 (к) 3 max	7, 14 $\pm$ 0, 08 7, 22 $\pm$ 0, 12	7, 56 $\pm$ 0, 09 7, 66 $\pm$ 0, 12	0, 41 $\pm$ 0, 06 0, 53 $\pm$ 0, 09	0, 85 $\pm$ 0, 11
	24	8 (эксп) 6 max	7, 71 $\pm$ 0, 06 7, 77 $\pm$ 0, 05	8, 33 $\pm$ 0, 09 8, 47 $\pm$ 0, 09	0, 62 $\pm$ 0, 09 0, 70 $\pm$ 0, 11	0, 41 $\pm$ 0, 08 0, 41 $\pm$ 0, 10
	25	5 (к) 3 max 10 (к) 6 max	7, 45 $\pm$ 0, 05 7, 51 $\pm$ 0, 07 7, 30 $\pm$ 0, 05 7, 36 $\pm$ 0, 03	8, 13 $\pm$ 0, 20 8, 37 $\pm$ 0, 09 7, 84 $\pm$ 0, 12 8, 03 $\pm$ 0, 03	0, 67 $\pm$ 0, 21 0, 95 $\pm$ 0, 04 0, 54 $\pm$ 0, 11 0, 74 $\pm$ 0, 11	0, 49 $\pm$ 0, 15 0, 08 $\pm$ 0, 12 -0, 04 $\pm$ 0, 16

рН, и здесь же, после обработки полем через 12 ч набухания, начинают проявляться эффекты ЭМП. При этом реакция отдельных семян неоднородна, что видно на выборке из образцов по 5 семян, имеющих максимальные локальные значения рН как в опыте, так и в контроле (см. таблицу 1). ЭМП-обработка практически не влияет на объемные значения рН, в отличие от локальных значений рН, где после ЭМП-обработки на этих этапах происходит постепенное нарастание отличий с контролем. Через 5 и 6 ч после окончания ЭМП-обработки они уже выходят за пределы ошибок измерений как для всего образца, так и для групп с более сильной реакцией. Но полученный эффект пока еще статистически не достоверен. ЭМП-обработка семян после 17 ч набухания и через 3 ч после воздействия поля еще не приводит к сколько-нибудь заметным эффектам. Но при большем сроке наблюдения после обработки изменения рН на 23 ч набухания наблюдали уже не только вблизи зародыша семени пшеницы, но и в объеме в целом, хотя в последнем случае они еще невелики. При этом локальные изменения после ЭМП-обработки у 6 семян с максимальными значениями рН по сравнению с 6 подобными семенами в контроле достигают 0,4 ед. рН и явно выходят за пределы тройной ошибки измерений ($p < 0,02$).

Наконец, измерения на 24 ч набухания после ЭМП-обработки на 20 ч и при расположении образца семян на подвеске выявили еще более заметные изменения. На этой стадии реакция семян становится более однородной. Изменения рН после ЭМП-обработки происходят и вблизи зародыша, и в объеме, причем в обоих случаях они превышают 0,4 ед. рН и явно выходят за тройную ошибку ($p < 0,02$ и $p < 0,01$). Следует отметить, что и абсолютные значения рН после ЭМП-обработки оказались заметно выше таких значений в контроле, зарегистрированных даже спустя 1 ч после окончания измерений опытной серии (таблица 1).

Следовательно, кратковременное воздействие ЭМП сверхнизкой частоты приводит к отчетливо выраженному ускорению изменений рН в процессе прорастания семян пшеницы. Такое ускорение происходит с запаздыванием на несколько часов, что может быть связано с ходом развития самого процесса, с использованием ресурсов клеточной стенки, имеющей более кислую среду (буферная емкость), с ролью щитка [189] или с другими причинами. При этом на ранних стадиях набухания реакция разных семян весьма неоднородна, тогда как к концу первых суток набухания такие различия заметно сглаживаются и практически все семена становятся чувствительными к ЭМП-обработке, включая воздействие ЭМП при расположении образца семян на подвеске.

7.5. Особенности эффектов ЭМП на разных стадиях прорастания семян пшеницы

Различный характер процессов на разных стадиях набухания и прорастания семян должен определять и разную эффективность влияния ЭМП обработки на этих стадиях, включая возможность как стимуляции, так и торможения метаболических процессов после такого воздействия. Для изучения вероятных эффектов ЭМП разного знака были выбраны семена пшеницы сорта «Инна» с всхожестью 50%. Было выполнено 50 серий опытов по 15-минутному воздействию ЭМП сверхнизких частот (аппарат МАГ-30-3, не имеющий вращающихся деталей, 50 Гц, 30 мТ) после 17 ч набухания семян, 34 серии по такому же воздействию после 24 ч набухания и 20 серий по длительному ЭМП-воздействию непрерывно в течение вторых суток набухания. Полученные данные сравнивали с результатами 59 серий в контроле, причем один или несколько контролей могли быть общими для разных вариантов ЭМП-обработки, выполненных в одни и те же дни [41, 252].

На рис. 39 приведено итоговое распределение числа семян, имеющих проростки или корни в контроле и разных вариантах опытов. Видно, что число таких семян в различных опытах и сериях меняется в весьма широких пределах. При среднем значении около 10 всходов из 20 семян в опыте число проросших семян в разных сериях меняется от 4 до 17, а число семян с корнями от 4 до 18. Все семена с проростками имеют корни, в отличие от семян с одними лишь корнями. Средние значения полученных чисел и статистический разброс данных в контроле и разных вариантах ЭМП-обработки даны в таблице 2.

Из данных таблицы 2 следует, что ЭМП-обработка после 17 ч набухания семян пшеницы, когда у них, по-видимому, происходит формирование корней, приводит к статистически достоверному превышению числа семян с проростками ($p < 0,01$) и еще большему приросту числа семян с корнями ($p < 0,01$) по сравнению с контролем. ЭМП обработка после 24 ч набухания вызывает меньшие эффекты, хотя и приближающиеся в случае проростков к данным для 17 ч. Но при этом эффект для корней меньше примерно в 3 раза по сравнению с эффектом для 17 ч и едва выходит за пределы разброса результатов. В то же время длитель-

Рис. 39. Итоговое распределение $P(N)$ чисел семян N из 20 семян в опыте, давших проростки (I) или корни (II) на шестые сутки набухания в контроле (а) и после ЭМП-обработки в течение 15 мин после 17 ч (б) и 24 ч (в) набухания, а также после длительной обработки в течение вторых суток набухания (г) семян пшеницы сорта «Инна» с всхожестью 50%

Таблица 2. Средние значения числа семян пшеницы (из 20 семян) имеющих проростки и корни в контрольных образцах и в семенах после ЭМП-обработки на разных стадиях набухания

	Число семян с проростками	Различие с контролем	Число семян с корнями	Различие с контролем
Контроль	$8,59 \pm 0,35$	—	$9,59 \pm 0,40$	—
17 ч набухания	$10,32 \pm 0,40$	$1,73 \pm 0,55$ ($p < 0,01$)	$12,30 \pm 0,37$	$2,71 \pm 0,55$ ($p < 0,01$)
24 ч набухания	$10,00 \pm 0,52$	$1,41 \pm 0,63$ ($p < 0,05$)	$10,44 \pm 0,56$	$0,85 \pm 0,68$
В течение второго дня набухания	$8,10 \pm 0,73$	$-0,43 \pm 0,81$	$10,05 \pm 0,68$	$0,46 \pm 0,79$

ная обработка полев семян на более поздней стадии — в течение вторых суток набухания, когда уже запущены процессы прорастания, — слабо влияет на число семян с корнями, хотя и несколько снижает число семян с проростками, формируемыми позднее. Последний эффект оказывается более заметным ($-1,30 \pm 1,00$), если сравнение проведено с данными контроля не во всех, а лишь в сериях измерений, выполненных в одни и те же дни.

Такие же тенденции, даже более заметно выраженные, наблюдаются и для другого показателя — длины проростков, измеряемой на шестые сутки после начала набухания (рис. 40). В связи с заметным разбросом длин проростков в разные дни опытов все результаты показаны в относительных единицах по сравнению с выбранными в качестве опорных средними значениями длин в контроле в каждый из дней измерений. В частности, приведенные на рис. 40 данные для 17 ч и 24 ч ЭМП-обработки соответствуют результатам серий измерений, выполненных в одни и те же дни. Можно видеть, что наибольшее влияние на длину проростков оказывает ЭМП-обработка после 17 ч набухания. Ускорение формирования корней воздействует и на длину проростков, и средняя их длина здесь составляет $26,86 \pm 0,41$ отн. ед. по сравнению с данными в одновременно выполненных сериях для контроля $19,42 \pm 0,41$ и для

Рис. 40. Итоговое распределение $P(L)$ длин проростков L семян пшеницы (в относительных единицах) на 6-ые сутки набухания в контроле (а) и после обработки низкочастотным ЭМП в течение 15 мин после 17 ч (б) и после 24 ч (в) набухания, а также после длительной обработки в течение вторых суток набухания (г) семян пшеницы сорта «Инна» с 50% всхожестью

24 ч набухания $22,46 \pm 0,45$ отн. ед. Различие между данными опыта и контроля статистически достоверно ($p < 0,01$).

Следовательно, имеет место отчетливо выраженный стимулирующий эффект ЭМП-обработки на 17 ч набухания, далеко выходящий за пределы тройного разброса средних значений длин проростков ($p < 0,01$). Эффект ЭМП-обработки после 24 ч заметно меньше, причем здесь отмечено и более широкое распределение длин проростков, по-видимому, связанное с неоднородностью образцов семян, отличающихся по времени начала своего прорастания. Вместе с тем, ЭМП-обработка в течение вторых суток набухания, когда уже наблюдается рост корней и проростков, начинающийся с растяжения клеток и их деления, демонстрирует не менее отчетливый эффект торможения ростовых процессов. Сравнение с данными контроля в одних и тех же сериях измерений показывает, что здесь средние значения длин проростков составляют лишь $15,04 \pm 0,62$ отн. ед., тогда как в контроле имеем $19,42 \pm 0,59$ отн. ед. Различие между этими величинами статистически значимо ($p < 0,01$).

Таким образом, обработка семян пшеницы ЭМП сверхнизкой частоты приводит к резко отличным эффектам на разных стадиях их набухания в ходе реализации генетической программы прорастания семян. В запуске и в реализации этой программы, несомненно, участвуют различные белки, последовательно высвобождаемые из связанного состояния и вступающие во взаимодействие с различными участками РНК и ДНК в ходе процесса набухания. Процессы высвобождения данных белков на этих стадиях, по-видимому, становятся чувствительными к ЭМП-обработке. Результатом подобных воздействий как раз и являются наблюдаемые эффекты стимуляции роста после ЭМП-обработки. При этом воздействие поля на стадии начала формирования корней приводит к увеличению числа семян с корнями примерно на одну четверть, что, в свою очередь, стимулирует рост проростков, длина которых увеличивается на 40 % по отношению к контролю. Данные эффекты проявляются заметно слабее на более поздней стадии, когда, по-видимому, происходит процесс формирования проростков. Здесь ЭМП-обработка практически влияет только на число семян с проростками и на некоторое увеличение их средней длины, причем здесь отмечается более широкий разброс данных, по-видимому, связанный с неоднородностью образцов семян, заметно отличающихся по своей всхожести и по времени начала прорастания.

Наконец, следует выделить и отчетливо выраженный эффект торможения роста проростков при длительном воздействии ЭМП на еще более поздней стадии прорастания семян. Здесь уже происходит активный рост корней и проростков, который начинается с растяжения клеток

и их последующего деления, причем в процессе деления клеток происходит как сборка, так и разборка различных надмолекулярных структур, например, микротрубочек [56]. Наблюдаемый эффект торможения роста проростков при длительной ЭМП-обработке семян на данной стадии позволяет считать, что эффекты ЭМП на процессы высвобождения и процессы связывания разных структур отличаются по своей направленности. В целом это приводит не к стимулирующему, а к тормозящему воздействию ЭМП на прорастание семян пшеницы.

Дополнительные данные о механизмах стимуляции и торможения метаболических процессов под действием ЭМП-обработки были получены при изучении эффектов растяжения мембран при набухании семян пшеницы в растворах сахарозы с разным осмотическим давлением, а также эффектов более длительного (непрерывно в течение нескольких суток) воздействия ЭМП сверхнизкой частоты на процессы прорастания семян с различной исходной всхожестью.

7.6. Эффекты ЭМП-обработки семян пшеницы при их набухании в растворах сахарозы с различным осмотическим давлением

Данные эксперименты были выполнены для изучения возможных эффектов ЭМП при разной степени растяжения мембран. Здесь мы исходим из того, что значительная часть белков высвобождается в ходе прорастания семян из связанного на мембранах состояния. При этом растяжение мембран в латеральном направлении должно зависеть от количества поступившей в клетки воды. Периферические белки связаны с мембраной в основном электростатическим взаимодействием с полярными группами фосфолипидов [122, 123, 125]. Обычно с белком граничит несколько десятков молекул липидов, число которых может меняться в зависимости от степени растяжения мембран. А это, в свою очередь, должно непосредственно влиять на переходы белков из связанного состояния в воду. Само же количество внутриклеточной воды зависит от наличия избыточного осмотического давления в клетках по сравнению с внешней средой. Такого избытка не будет при набухании в растворах осмотически активных веществ, в том числе сахарозы, которая сама по себе не должна вносить каких-либо нарушений. Но от нее будет зависеть степень растяжения мембран, что, возможно, и определяет наблюдаемое в подобных случаях снижение всхожести семян [277]. И если именно процессы высвобождения белков ограничивают процесс прорастания, то дополнительное воздействие со стороны ЭМП должно вызывать заметное повышение всхожести семян. Данное предположение

послужило основой для изучения эффектов ЭМП при набухании семян пшеницы в растворах сахарозы различной концентрации [42].

На рис. 41 приведены данные по изменению всхожести семян пшеницы после 10 мин ЭМП-обработки через 15 ч их набухания в воде или в растворах сахарозы с разным осмотическим давлением. Видно, что во всех случаях ЭМП-обработка приводит к повышению всхожести семян, причем в растворах сахарозы, исключая растворы с относительно высоким осмотическим давлением, наблюдаются более значительные эффекты ЭМП и более заметный разброс данных по сравнению с набуханием семян в воде (табл. 3). Такой разброс, как уже отмечалось, обусловлен неоднородностью образцов семян, которая отмечается даже в пределах одной партии. В частности, в нашем случае начало прорастания семян (их наклевывание) находится в интервале примерно от 15 ч до 60 ч набухания в воде с максимумом числа проросших между 24 и 48 ч. Неоднородность семян особенно отчетливо проявляется в растворах сахарозы, для которых характерно более широкое распределение всхожести в разных опытах. Здесь, наряду с основной группой опытов, можно выделить некоторую их часть, которая заметно отличается от нее по всхожести. При осмотическом давлении 10 и 12,4 атм. доля опытов с отклонениями в сторону низкой всхожести еще невелика, тогда как в большинстве других еще сохраняется высокая всхожесть семян и, кроме того, они активно реагируют на ЭМП. В результате в ряде опытов всхожесть после ЭМП обработки приближается к данным для семян, набухавших в воде (рис. 41). Неоднородность еще более заметно проявляется при переходе к осмотическому давлению 13,5 атм., хотя и здесь ЭМП обработка существенно влияет на прорастание семян. Дальнейшее увеличение концентрации сахарозы приводит к тому, что уже большинство семян имеет низкую всхожесть и лишь в небольшой части опытов она сохраняется на достаточно высоком уровне. Но в целом при осмотическом давлении 14,6 атм. и 16 атм. прорастает менее половины семян, причем здесь наблюдается также резкое уменьшение эффектов ЭМП-обработки (табл. 3).

Следовательно, уменьшение всхожести семян пшеницы в растворах сахарозы по сравнению с водной средой может быть в значительной степени восстановлено путем ЭМП-обработки на стадиях, когда происходит высвобождение белков из связанного состояния. Это является еще одним доводом в пользу того, что именно связь белков с мембраной является лимитирующим фактором для задержки прорастания семян. Семена из-за отсутствия избыточного осмотического давления внутри клеток по сравнению с внешней средой не могут набрать необходимое количество воды. В свою очередь, из-за низкой степени растяжения мембран связь периферических белков с мембраной остается достаточно прочной,

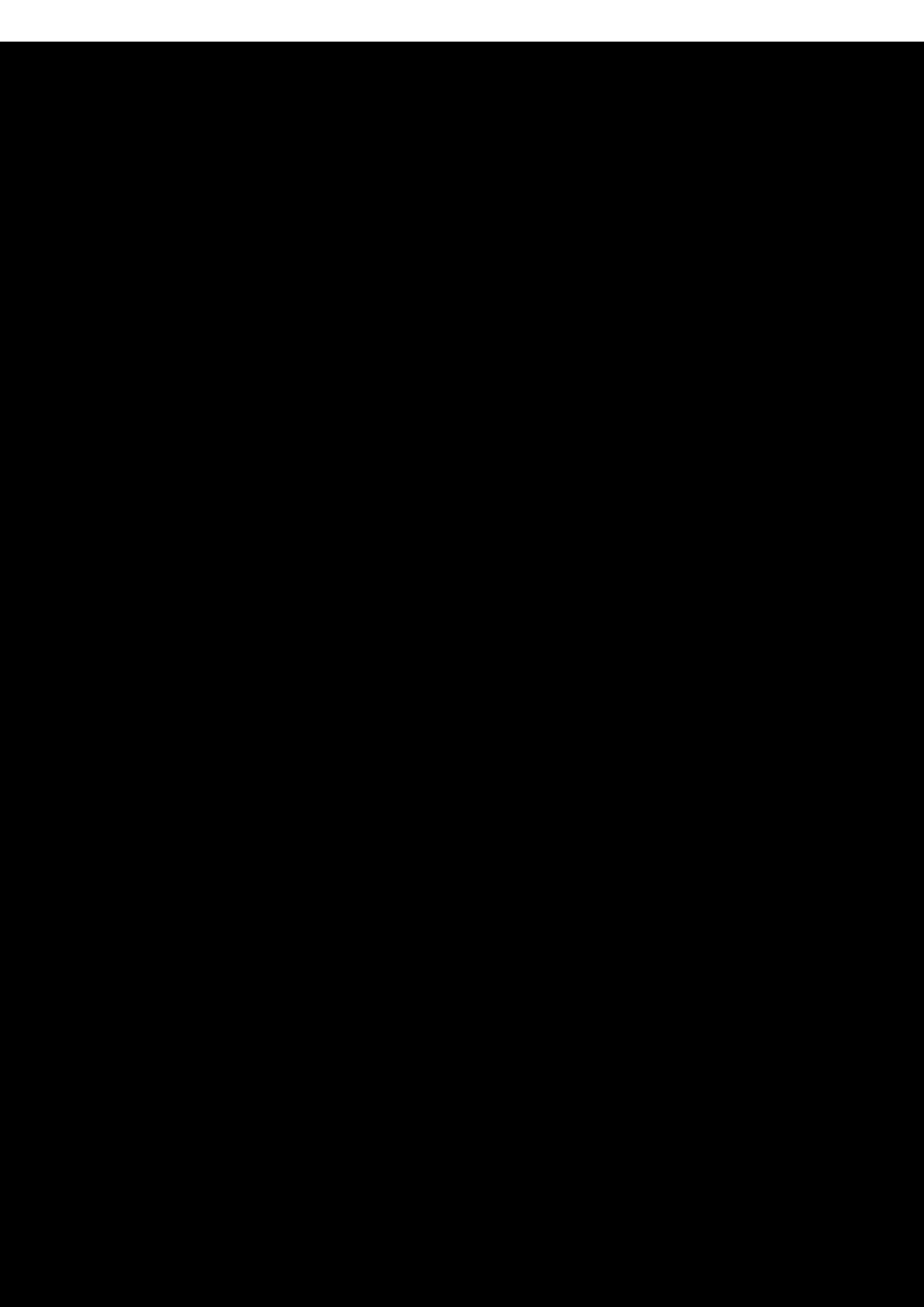


Таблица 3. Всхожесть семян пшеницы сорта «Заря» урожая 1998 г. при их набухании в растворах сахарозы с различным осмотическим давлением и ее изменение после 10 мин ЭМП обработки через 15 ч набухания

Осмотическое давление (атм)	Число опытов	Всхожесть (из 50 семян)	Всхожесть после ЭМП обработки	Изменение всхожести
Контроль (вода)	40	43, 12 ± 0, 44	46, 48 ± 0, 33	3, 35 ± 0, 55
10	30	36, 57 ± 0, 90	41, 40 ± 0, 80	4, 83 ± 1, 20
12,4	32	31, 00 ± 1, 08	36, 78 ± 1, 20	5, 78 ± 1, 62
13,5	24	24, 67 ± 1, 33	31, 42 ± 1, 04	6, 75 ± 1, 70
14,6	23	24, 17 ± 0, 61	26, 61 ± 0, 85	2, 44 ± 1, 05
16,0	21	16, 52 ± 0, 27	18, 70 ± 0, 47	2, 24 ± 0, 54

и для их высвобождения необходимо какое-то дополнительное воздействие извне. Такое воздействие как раз и оказывает ЭМП-обработка набухающих семян, причем его результатом являются переходы белков из связанного состояния в воду и запуск с их помощью дальнейших процессов, необходимых для прорастания семян. В то же время при повышении осмотического давления в среде набухания до 14,6 и 16 атм. подобное воздействие оказывается слишком слабым, и здесь отмечены лишь сравнительно небольшие эффекты ЭМП-обработки.

Таким образом, результаты изучения эффектов ЭМП-обработки семян, набухающих в растворах сахарозы, находятся в хорошем соответствии с предложенным физико-химическим механизмом воздействия ЭМП сверхнизких частот на биологические процессы. Они указывают также и на еще один из возможных механизмов влияния тургорного давления внутри клеток [189] на рост растений.

7.7. Влияние длительного воздействия ЭМП на прорастание семян пшеницы

Другой тип эффектов ЭМП сверхнизких частот проявляется в случае более длительного, в течение нескольких суток, воздействия ЭМП на набухающие семена пшеницы с различной всхожестью. Такое воздействие может наблюдаться, например, во время магнитных бурь. Длительная стимуляция процессов высвобождения белков и торможение их связывания при ЭМП-обработке, в принципе, способны оказать неблагоприятное влияние на жизнедеятельность организма, особенно при наличии у него каких-либо отклонений от нормы. Здесь можно ожидать не только отмеченного выше общего торможения роста при повышенной

метаболической активности, но и, при более длительном воздействии, также других эффектов, особенно существенных для ослабленных семян.

В таблице 4 приведены сводные результаты изучения эффектов непрерывного воздействия ЭМП-обработки на прорастание семян пшеницы с различной всхожестью. Обработку проводили в течение всех 6 суток набухания. Из этих данных следует, что длительная ЭМП обработка приводит не только к замедлению роста проростков, но и к достоверному снижению всхожести семян. Для семян сорта «Мионовская-808» снижение всхожести составляет около одной пятой. Снижение того же порядка было отмечено и в опыте с семенами сорта «Заря» с примерно такой же всхожестью. Достоверно уменьшилась на одну пятую также длина полученных проростков. В то же время для семян сорта «Инна» с существенно более низкой жизнеспособностью снижение всхожести достигает двух раз и примерно в полтора раза падает длина оставшихся проростков (табл. 4).

Следовательно, несмотря на стимулирующее воздействие ЭМП-обработки на ранних этапах прорастания семян пшеницы, обработка семян на последующих этапах прорастания вызывает отчетливо выраженное торможение ростовых процессов и даже значительное падение всхожести. Последнее оказалось особенно существенным для семян с низкой всхожестью.

Еще одна серия экспериментов была выполнена с целью выделения наиболее чувствительной к ЭМП-обработке стадии прорастания семян. Для этого ЭМП-обработка была разделена на 2 части: непрерывное воздействие от начала набухания до конца первых суток или же начиная со вторых суток вплоть до окончания шести суток набухания. Однако 8 серий опытов на семенах пшеницы «Мионовская-808» и «Заря» не позволили выявить достоверные различия между указанными вариантами, что, по-видимому, связано с неоднородностью образцов семян, заметно отличающихся по времени начала прорастания. Можно говорить лишь о тенденции более активного прорастания семян, обработанных в первые сутки, по сравнению с более поздними сроками обработки. Здесь необходимы дальнейшие исследования.

Таким образом, длительное воздействие ЭМП сверхнизких частот в течение всего срока набухания (6 суток) приводит не только к снижению скорости роста проростков, но и к общему падению всхожести. При этом семена с низкой всхожестью особенно восприимчивы к длительной обработке ЭМП, и их всхожесть падает практически в 2 раза, тогда как у семян с более высокой всхожестью данный эффект составляет лишь около одной пятой. Заметно уменьшилась и длина полученных проростков. Подобный результат на фоне отчетливо выраженного сти-

Таблица 4. Всхожесть и средняя длина проростков для семян различных сортов пшеницы после ЭМП-обработки семян в течение всех 6-ти суток набухания

	Всхожесть (из 50 семян)		Средняя длина проростков (мм)	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
«Мироновская-808»				
	38		60,2	
	38	30	57,3	36,4
	36	28	52,6	41,7
	43	37	53,5	39,3
	37	30	53,5	44,7
	36	27	58,4	44,5
	40	34	48,0	40,5
Среднее	38,3±0,9	31,0±1,5	57,0±1,7	41,2±1,8
«Заря»				
	41		35,6	
	39	33	50,1	41,8
«Инна»				
	8	2	46,8	28,5
	10	4	40,7	27,5
	12	5	44,2	30,2
	10	5	45,1	31,0
	10	6	43,6	29,2
	12	6	44,4	33,1
Среднее	10,6±0,6	4,7±0,6	44,1±1,5	29,8±1,6

мулирующего эффекта ЭМП-обработки на ранних этапах прорастания указывает на сложный характер воздействия ЭМП, который не сводится лишь к стимуляции высвобождения и к торможению связывания белков с другими биологическими структурами. Как отмечено выше, дополнительное воздействие со стороны ЭМП способно активировать процессы и в растворах сахарозы с более высоким порогом запуска. Такая активация может привести к стимуляции также более поздних стадий развития и нарушить нормальную последовательность реакций в ходе процессов прорастания семян за счет их десинхронизации. Последнее особенно существенно при прохождении процессов морфогенеза. Кроме того, стимуляция высвобождения и торможение связывания белков должно создавать состояние повышенной возбудимости внутри клеток

и в организме в целом. Должен наблюдаться и повышенный распад белков по сравнению с иммобилизованным на мембранах и других структурах состоянием белков [70].

7.8. Обсуждение

Прежде всего, следует остановиться на достоверности наблюдаемых эффектов ЭМП сверхнизкой частоты, в которых, как было показано, решающую роль играет воздействие именно электромагнитного поля, и в заметно меньшей степени вибрации. На достоверность эффектов ЭМП указывают не только значительные различия между данными опыта и контроля, отчетливо выходящие за пределы ошибок измерений, но и согласующийся с типом биологических процессов различный характер эффектов ЭМП на разных стадиях набухания и прорастания семян пшеницы. Это относится к разной чувствительности семян к ЭМП в ходе их набухания, к наличию эффектов как стимуляции, так и торможения биологических процессов, соответствующих их особенностям на разных стадиях прорастания, к качественному различию кинетики выхода продуктов реакции в контроле и в опыте после ЭМП-обработки и т. д. Наконец, все наблюдаемые виды эффектов ЭМП сверхнизкой частоты, по крайней мере, не противоречат друг другу, а также предложенному нами механизму воздействия ЭМП на живые системы и не требуют для своего объяснения каких-либо дополнительных предположений.

Полученные данные показывают, что ЭМП-обработка стимулирует активацию ферментов эстераз именно на той стадии, когда в ходе набухания семян в клетках достигнута высокая оводненность и там создаются близкие к равновесным условия для связанного и свободного состояний определенных белков. В результате на данной стадии происходит высвобождение ферментов эстераз и здесь даже слабое ЭМП-воздействие, усиленное нелинейными эффектами, может стимулировать подобный процесс. Имеются данные и других авторов в пользу высвобождения белков под действием ЭМП обработки [160].

Связь активации эстераз с их высвобождением из связанного состояния согласуется и с данными по высокой скорости гидролиза ФДА на начальной стадии набухания старых семян (рис. 36 б), когда с поступлением воды, по-видимому, происходит выход эстераз из поврежденных клеток в межклеточное пространство. С эффектами высвобождения эстераз должно быть связано и появление нового пика их активности в старых семенах со сдвигом на 10–12 ч по сравнению с семенами с высокой всхожестью, так как формирование равновесных условий в клетках старых семян должно происходить с запаздыванием, лишь после прохо-

ждения восстановительных процессов. Следует отметить и тот факт, что и в семенах с промежуточным значением всхожести максимум выхода ФЛ наблюдается также в промежуточном интервале времени набухания (рис. 37) по сравнению с вышеупомянутыми видами семян. Косвенно с эффектами высвобождения белков, по-видимому, связано и изменение проницаемости мембранных структур после ЭМП-обработки на тех же или более поздних стадиях набухания. На этой основе объяснимо и замедление выхода ФЛ из клеток со временем после ЭМП-обработки, хотя, согласно данным измерений рН у зародыша, скорее следовало ожидать роста выхода ФЛ из-за дополнительного закисления внутренней среды семян, наблюдаемого с некоторым запаздыванием после ЭМП-воздействия (таблица 1). С эффектами уменьшения проницаемости мембран и восстановления барьерной функции поврежденных мембран в старых семенах после ЭМП-обработки связано и падение выхода из них других веществ, которые могла бы использовать микрофлора. Это может объяснить также эффект ЭМП по заметному повышению всхожести старых семян [26], которая в значительной степени зависит от состояния мембранных структур [33, 300, 305, 345]. Сам же механизм влияния ЭМП на барьерную функцию мембран за счет стимуляции высвобождения белков и, возможно, более сложных надмолекулярных структур по существу аналогичен эффекту повышения вязкости цитоплазмы. Подобное повышение вязкости наблюдают, в частности, после повреждения мембран при введении в клетку микроэлектрода, а с этим, в свою очередь, связывают заживление возникших при этом повреждений [58, 96]. Следует отметить, что воздействие ЭМП на барьерную функцию мембран происходит именно на той стадии, когда в клетках сформированы близкие к равновесным условия. В результате после ЭМП-обработки наблюдается увеличение выхода ФЛ с последующим его замедлением со временем.

Кроме того, на основе эффектов стимуляции высвобождения белков могут быть объяснены и результаты влияния ЭМП-обработки на число семян с корнями и с проростками, а также на длину проростков при ее применении на соответствующих стадиях набухания семян. Хотя точное время начала таких процессов неизвестно, так как регистрируют лишь их более поздние стадии, связанные с появлением уже сформированных корней и проростков из семян, тем не менее очевидно, что каждый из процессов начинается заметно раньше и что в них принимают участие определенные белки, исходно присутствующие в семенах в связанном состоянии. В ходе процесса набухания они высвобождаются из такого состояния, и в это время их переходы, по-видимому, становятся чувствительными к ЭМП-обработке, причем различным временам набухания соответствуют и разные эффекты стимуляции роста корней либо

проростков после ЭМП-обработки. Наряду с ними, по-видимому, высвобождаются и другие структуры, влияющие на восстановление барьерной функции мембран, что в целом при воздействии на стадии формирования корней приводит к увеличению числа семян с корнями примерно на одну четверть. Рост же корней стимулирует и процесс развития проростков из семян с увеличением их длины на 40% по сравнению с данными измерений в контроле. Эффекты ЭМП-обработки на рост корней проявляются заметно слабее на более поздней стадии, когда, по-видимому, начинается процесс формирования проростков. Здесь ЭМП-обработка практически влияет только на число семян с проростками и на некоторый прирост их средней длины, причем в этом случае отмечается более широкий разброс данных, по-видимому, связанный с неоднородностью образцов семян, отличающихся по всхожести и времени начала прорастания. Различия по времени начала прорастания могут объяснить и некоторый, хотя и статистически недостоверный прирост числа семян с корнями при ЭМП обработке на этой стадии.

Полностью согласуются с приведенными выше данными и результаты влияния ЭМП обработки на прорастание семян пшеницы при их набухании в растворах сахарозы при разной степени растяжения мембран. В соответствии с механизмом такая обработка должна быть пусковым механизмом для запуска процессов прорастания, что отчетливо проявляется в уменьшении эффектов, связанных с падением всхожести в данных растворах.

Предлагаемый механизм влияния ЭМП-обработки лежит в основе и отчетливо выраженного эффекта торможения роста проростков в ходе длительного воздействия ЭМП на более поздней стадии — в течение вторых суток прорастания семян. Здесь ЭМП практически не влияет на число семян с проростками и с корнями, поскольку на этой стадии начальные процессы уже запущены и происходит активный рост тех и других. Известно, что процессы деления клеток в ходе роста включают несколько стадий, при которых происходит как сборка, так и разборка различных надмолекулярных структур [56]. Наблюдаемый эффект торможения роста проростков при длительной ЭМП обработке семян на данной стадии прорастания позволяет считать, что влияние ЭМП на процессы сборки и разборки различных надмолекулярных структур, по-видимому, отличаются по своей направленности. В целом это может привести к нарушению синхронности прохождения процесса деления, результатом которого является не стимулирующее, а тормозящее воздействие ЭМП на прорастание семян пшеницы. Подобное тормозящее воздействие особенно отчетливо проявилось при более длительном 6-суточном воздействии ЭМП, причем его результат, как и следовало ожидать, в наибольшей степени проявился у семян с низкой всхожестью.

Падение всхожести у них достигало двух раз по сравнению примерно с одной пятой у семян с более высокой всхожестью.

С предлагаемым механизмом влияния ЭМП на биологические процессы согласуется и еще один эффект — отчетливо выраженное ускорение изменений рН вблизи поверхности зародыша, а затем и в объеме в целом после такого воздействия. Данный процесс наблюдается спустя несколько часов после ЭМП обработки и на более поздних стадиях набухания по сравнению с активацией эстераз. Подобное запаздывание может быть связано с особенностями развития процесса изменения рН, где проявляется суммарная реакция ряда клеток в разном исходном состоянии. На него может влиять и возможное использование ресурсов клеточных стенок, имеющих кислую среду, а также воздействие со стороны щитка [189]. Все это приводит к заметному разбросу данных для разных семян, особенно на сравнительно ранних стадиях набухания. Тем не менее, и в данном случае процессы изменения рН происходят лишь после того, как в клетках успели сформироваться близкие к равновесным условия и они становятся чувствительными к слабым ЭМП-воздействиям.

Наконец, следует отметить, что полученные данные по эффектам ЭМП-обработки в семенах пшеницы важны не только для понимания механизмов воздействия ЭМП на живые системы. Они могут найти применение также для изучения молекулярных и физико-химических механизмов запуска процессов прорастания на тех стадиях, когда еще не регистрируются внешние признаки их прохождения.

Наши данные о зависимости биологических эффектов от создания внутри клетки близких к равновесным условий находятся в соответствии с результатами других авторов. Эти результаты подтверждают, что биологические эффекты ЭМП сверхнизких частот чувствительны к метаболическому состоянию клетки [71, 279, 353, 357]. Смещение баланса сил внутри клетки в том или ином направлении способно привести к повышению или к снижению чувствительности метаболических процессов к воздействию ЭМП.

7.9. Заключение

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные находятся в полном соответствии с предлагаемым механизмом воздействия низкочастотного ЭМП на биологические процессы. При этом весьма слабое в каждой точке внешнее воздействие проявляется практически во всем объеме клетки, но его эффекты в конечном счете, по-видимому, локализуются в значительно более узком примембранном слое и дополни-

тельно усиливаются за счет различных нелинейных явлений. В результате там происходит изменение ионной силы и pH с последующим их влиянием на высвобождение белков, иммобилизованных на мембранах или других клеточных структурах. Высвобождение белков, в свою очередь, приводит к активации метаболических процессов. На основе данного физико-химического механизма удастся объяснить также парадоксальную зависимость ЭМП-эффектов в организмах, включая их чувствительность к геомагнитным и космофизическим флуктуациям, и ослабление биологических эффектов с ростом амплитуды ЭМП. Этот механизм создает основу также для интерпретации биологических эффектов ЭМП промышленных частот. Такие эффекты наблюдаются при напряженности поля на три порядка более высокой по сравнению с полями геомагнитных флуктуаций, в полном соответствии с отношением частот данных ЭМП. Следовательно, нетепловые биологические эффекты ЭМП сверхнизких частот не имеют прямой связи с их энергией, которая может отличаться на несколько порядков величины на различных частотах.

Предлагаемый механизм позволяет также подойти к интерпретации как стимулирующих, так и тормозящих эффектов ЭМП сверхнизких частот. Тормозящие эффекты, особенно в случае длительного ЭМП-воздействия, являются результатом десинхронизации сложных многостадийных процессов вследствие разной направленности эффектов ЭМП на различных их стадиях — стимуляции одной стадии и торможения другой. Вместе с тем под действием ЭМП возможна также активация реакций с более высоким порогом возбуждения, что может привести к нарушению нормальной последовательности метаболических процессов. Последнее особенно существенно для процессов морфогенеза. При этом стимуляция высвобождения белков и торможение их связывания должно создавать состояние повышенной возбудимости в организме. Подобное воздействие, особенно в случае длительных магнитных бурь и их единовременного влияния на многие организмы, может быть дополнительно усилено за счет взаимного воздействия одних организмов на другие, что создает основу для массового проявления эффектов ЭМП сверхнизких частот.

Наличие состояния повышенной возбудимости в организмах в случае длительного ЭМП-воздействия позволяет подойти на физико-химической основе к объяснению данных [241, 242] о связи периодов повышенной солнечной активности с их воздействием на организм человека и на целый ряд явлений, в том числе, творческого и социального характера. Чижевский А. Л. в книге “Физические факторы исторического процесса” проанализировал исторические события за 2300 лет в 75 странах и пришел к выводам о том, что эмоциональная напряженность человеческих сообществ может коррелировать с солнечной активностью. В даль-

нейшем к аналогичным выводам пришли и зарубежные авторы, которые показали, что Золотой Век Ренессанса, Барокко, Рококо и другие наиболее известные культурные «взрывы» приходились на пики солнечной активности. До сих пор считают, что наиболее мощный культурный «взрыв» имел место в эпоху Возрождения, когда за одно десятилетие на единице площади рождалось гениев больше, чем в другие периоды за тысячелетие. В ряде работ, опубликованных за последние 30 лет, был проведен анализ закономерностей появления выдающихся произведений живописи и поэзии, а также научных открытий за период 1400–1800 гг. Показано наличие периодичности творческой активности в западноевропейской и китайской живописи, поэзии и науке. Как правило, пики творчества в Китае соответствовали европейским» (цит. по [204]). Все эти данные полностью согласуются с предположением о наличии в организмах состояния повышенной возбудимости и возможности его массового проявления при длительном воздействии магнитных бурь.

Вместе с тем, повышенная возбудимость организмов под влиянием солнечной активности может приводить и к другим, не всегда желательным результатам. Корреляция с активностью Солнца имеет место для ряда социальных явлений и во 2-ой половине XX века, где можно отметить резкую активацию массовых движений и военных действий в периоды повышенной солнечной активности (табл. 5). В те же периоды отмечен заметный рост числа публикаций в русскоязычной прессе о неопознанных летающих объектах (НЛО) (табл. 6) [83], что в принципе, хотя и не во всех случаях, может быть объяснено за счет эффектов повышенной возбудимости наблюдателей.

Наконец, повышенная возбудимость организмов под воздействием ЭМП сверхнизких частот, возникающих в качестве предвестников землетрясений, может объяснить чувствительность некоторых видов животных, особенно обитающих в земле, к данным природным явлениям.

Имеется и еще одна сторона воздействия ЭМП сверхнизких частот. Повышенная возбудимость в периоды магнитных бурь на Солнце создает, наряду с активацией метаболических процессов, также повышенную нагрузку на организм. С этим фактором, по-видимому, связано обострение различных заболеваний в такие периоды, что отмечалось многими авторами [71, 92, 168, 241]. Одновременно здесь необходимо учитывать и возможность проявления повышенной активности самих носителей заболеваний под действием ЭМП, что может дополнительно усилить их воздействие.

Таким образом, предложенный механизм воздействия ЭМП и результаты наших экспериментов позволяют объяснить на физико-химической основе практически все имеющиеся противоречия и парадоксы биологических эффектов ЭМП низких и сверхнизких частот. Это отно-

Таблица 5. Влияние солнечной активности на различные события в международной жизни после второй мировой войны

Максимумы активности Солнца	События
1956–1957 гг.	События в Венгрии и Польше Суэцкий кризис
1967–1968 гг.	Арабо-израильская война События в Чехословакии
1979–1980 гг.	Исламская революция в Иране Начало войны в Афганистане Начало войны Ирака с Ираном
1990–1991 гг.	События в СССР, Румынии, ГДР Война Ирака с Кувейтом Начало войн в Югославии
2000–2002 гг.	Бомбардировки Югославии Активизация терроризма Война США против Афганистана Война США и Англии против Ирака

Таблица 6. Распределение частот упоминаний об НЛО в русскоязычной периодике [83]

Максимумы числа упоминаний	1966–1973 гг.
	1978–1980 гг.
	1989–1992 гг.
	1999–2002 гг.

сится к отсутствию непосредственной связи между наблюдаемым эффектом и энергией поля, включая ослабление эффектов при росте амплитуды ЭМП и чувствительность организмов к воздействию геомагнитных флуктуаций и магнитных бурь на Солнце. Находит объяснение и воздействие ЭМП промышленных частот при напряженности на 3 порядка более высокой. Не противоречит данному механизму и наблюдение эффектов разного знака, когда возможна стимуляция или десинхронизация хода метаболических реакций. Такие различия определяются состоянием организма и типом проходящих в нем процессов. Существенное влияние

здесь оказывает и длительность воздействия ЭМП. Все эти результаты не противоречат представлениям традиционной физики и не требуют участия каких-либо неизвестных нам факторов.

Переходы белков из связанного на мембранах состояния в воду и обратно должны играть роль и при рассмотрении эффектов других, более высокочастотных диапазонов ЭМП, в частности, крайне высоких частот (КВЧ), относящихся к миллиметровому диапазону длин волн [111, 112, 298]. Но здесь в качестве действующего фактора, влияющего на такие переходы, должно выступать не изменение ионной силы в примембранном слое, а изменение состояния воды, поскольку в данном диапазоне находится максимум поглощения дипольных моментов ее молекул. При этом, как уже отмечалось, достаточно изменения вклада со стороны водного компонента в пределах до 10 ккал/моль при общей энергии гидратации на макромолекулу белка 10^3 – 10^4 ккал/моль.

ГЛАВА 8

Влияние замораживания и высушивания на биологические структуры

8.1. Введение

Особое место в общей проблеме взаимодействия воды с различными биологическими структурами занимают вопросы, связанные с выяснением роли воды в процессах перехода организмов в состояние глубокого покоя, прежде всего за счет замораживания или высушивания. Один из таких вопросов связан с необходимостью объяснения, на основе развиваемых нами представлений, самой возможности длительного сохранения жизнеспособности организмов в условиях, когда отсутствуют процессы репарации и воспроизводства. Необходимо оценить также возможные временные пределы такого сохранения. Другой вопрос относится к влиянию самого процесса перехода, при котором происходит изменение равновесия сил в пределах различных биологических структур, на состояние таких структур и организма в целом.

В большинстве исследований подобных вопросов, имеющих, как известно, важное практическое значение, водная среда обычно рассматривается независимо от взаимодействующих с нею структур и, как правило, учитывается лишь степень связывания воды различными макромолекулярными и мембранными структурами. При изучении процессов замораживания главное внимание уделяется предотвращению прямых или косвенных, за счет локального повышения концентрации солей, эффектов льдообразования [66, 161, 200]. В случае же высушивания обычно речь идет, в первую очередь, о предотвращении дестабилизации структуры клеточных мембран [65].

Вместе с тем, рассмотрение одних лишь эффектов самой водной среды не объясняет наблюдаемых существенных различий в устойчивости различных форм жизни к замораживанию или к частичной или более или менее полной потере воды. Хорошо известно также, что устойчивость биологических систем к процессам замораживания и высушивания

весьма существенно зависит от условий функционирования организмов и от фазы их роста [65, 200]. Уже это показывает, что предотвращение льдообразования внутри клеток и разработка оптимальных методов удаления из них воды решают далеко не все вопросы сохранения жизнеспособности различных организмов после воздействия на них замораживания или высушивания. Необходимо учитывать также возможность изменения состояния самих биологических структур из-за нарушения (в ходе этих процессов) равновесия сил на различных уровнях организации биологических систем.

8.2. Эффекты на макромолекулярном уровне

Изменения структуры в процессе замораживания–высушивания возможны уже на уровне макромолекул биополимеров. При замораживании биологических объектов для предотвращения эффектов льдообразования в клетках обычно используют различные криопротекторы [161, 200]. Но одновременно криопротекторы влияют на гидрофобное взаимодействие, которое должно уравновесить разрыхляющее воздействие молекул воды на структуру белковых макромолекул, что, в свою очередь, может привести к необратимым изменениям конформации белков. Уменьшение вклада гидрофобных взаимодействий имеет место и в чисто водной среде при понижении температуры [351], в результате чего возможна холодовая денатурация белков [105]. Такого рода эффекты вполне реальны в определенной области отрицательных температур, несмотря на вымораживание основной массы воды. Особенности структуры воды обуславливают сохранение ею подвижности в ближайшей окрестности макромолекул или вблизи других растворенных веществ вплоть до -60°C , когда подвижность может быть непосредственно зарегистрирована методом ЯМР [149], и даже до -130°C , когда после длительного хранения наблюдали эффекты рекристаллизации льда в клетках [203].

С подвижностью воды связано и существование мелкомасштабной конформационной подвижности белков, регистрируемой прямыми методами, по крайней мере, до температур $-50 \div -60^{\circ}\text{C}$ и ниже [47, 80, 225]. И хотя для денатурации белков необходимы крупномасштабные изменения их структуры, возможность денатурации не исключена при достаточно длительном пребывании организма при таких температурах. При этом присутствие криопротектора может сыграть и отрицательную роль из-за нарушения равновесия сил и наличия более значительно объема незамерзшей среды вокруг макромолекул. Следует учитывать и возможность повышения концентрации не только солей [66], но и криопротектора вблизи поверхности макромолекул белков при пони-

жении температуры. Последний эффект, в частности, наблюдали для системы диметилсульфоксид–вода–сывороточный альбумин при низких температурах [31]. Вероятность изменений структуры макромолекул заметно возрастает при более высоких температурах по сравнению с указанными выше, т. е. при $-40^{\circ} \div -20^{\circ} \text{C}$, причем область промежуточных температур, как и промежуточная область влажности, может иметь критическое значение для организмов. И так же, как в рассмотренных ранее случаях, решение одной задачи (по предотвращению льдообразования) в водной среде внутри клеток способно привести к появлению затруднений в другом случае — к возможности нарушения равновесия сил в пределах белковых макромолекул.

В то же время переход к существенно более низким температурам (ниже -130°C), при которых отсутствуют процессы рекристаллизации (если исключить возможность химических и радиационных воздействий), может привести к практически бессрочному переживанию замороженных организмов [11].

Значительно увеличивается время переживания и в случае высушивания, когда, как уже отмечалось, резко возрастает стабильность макромолекул биополимеров. При относительной влажности менее 0,3 стабильность, например, структуры ДНК возрастает до почти постоянного максимального значения [179], примерно постоянную величину приобретает кажущаяся удельная теплоемкость белка [202] и резко уменьшается подвижность в пределах белковых макромолекул [9, 157, 225]. В результате становится невозможным прохождение биологических реакций, связанных с изменением конформации белков [14].

Следовательно, высушивание приводит к заметным отклонениям от равновесия сил в пределах макромолекул биополимеров, наличие которого в присутствии воды определяло появление конформационной подвижности, связанной с преодолением относительно низких активационных барьеров. Состояние системы меняется качественным образом, и в этом случае не имеет смысла говорить о каких-либо метаболических процессах, которые могли бы способствовать восстановлению нарушений, возникших в процессах хранения. Вместе с тем, в высушенных биологических макромолекулах не прекращаются другие процессы, в том числе и такие, которые связаны с преодолением относительно больших барьеров, что вполне реально при повышенных температурах. Однако если речь идет о хранении покоящихся организмов в течение длительных сроков, то, в соответствии с теорией абсолютных скоростей химических реакций, следует учитывать определенную вероятность их прохождения и при обычных температурах среды [11]. Как уже отмечалось, длительное пребывание остатков организмов в геологических отложениях приводит к рацемизации ряда аминокислот, а также к разрушению наименее

теплостойких аминокислот в течение сотен тысяч и миллионов лет [114]. Происходит также депуринизация нуклеотидов и другие процессы в нуклеиновых кислотах [88]. Для нарушения жизнеспособности даже самых стойких организмов, по-видимому, достаточны уже частичные нарушения такого рода. Расчеты показывают, что эффекты, вызывающие гибель организмов под воздействием энергии теплового возбуждения при 160°C в течение одного часа, могут быть получены при обычных температурах за срок порядка 10^4 – 10^5 лет [11]. При хранении менее стойких форм жизни или при наличии у них значительного количества нарушений, полученных, например, в ходе процесса высушивания, летальное воздействие может быть произведено и за срок, на несколько порядков меньший. Поэтому даже для высушенных организмов более эффективным является их хранение при пониженных температурах. Длительность хранения уже при 0°C в отсутствие других повреждающих факторов, например кислорода и радиации, может быть увеличена на два порядка по сравнению с хранением при комнатной температуре, а при температурах на десятки градусов ниже нуля — практически до бесконечности [11]. Но здесь решающим фактором становится защита от ионизирующей и других видов радиации.

Таким образом, воздействие замораживания или высушивания на макромолекулы биополимеров и использование при этом для предотвращения льдообразования различных защитных сред могут привести к сложным эффектам, обусловленным нарушением равновесия сил в пределах биологических макромолекул. В результате, наряду с ростом их устойчивости к длительному хранению, могут возникать и необратимые изменения структуры биополимеров, вероятность которых особенно возрастает при промежуточных значениях относительной влажности или при хранении в водной среде с криопротекторами при температурах до нескольких десятков градусов ниже нуля. При длительном хранении такие необратимые изменения могут появиться и при более низких значениях температуры и влажности.

8.3. Эффекты на мембранном уровне

Макромолекулы белков, вместе с тем, являются структурами, далеко не самыми чувствительными к нарушению равновесия в организмах. Основные повреждающие эффекты замораживания или высушивания обычно связывают с мембранами, для которых вода, как известно, является стабилизатором их нативной структуры. При этом решающая роль в повреждении мембран в процессах замораживания отводится образованию льда и связанному с образованием льда температурно-осмо-

тическому шоку [66], тогда как к повреждающим эффектам высушивания относят дестабилизацию мембранных структур и нарушение барьерной функции мембран для низкомолекулярных веществ [64, 65]. Происходящее при этом нарушение липидного биослоя мембран связывают с образованием гексагональной фазы для липидов, что подтверждается опытами с модельными фосфолипидными системами [122, 123]. Однако данные модельных опытов далеко не всегда можно переносить на такие сложные многокомпонентные системы, какими являются биологические мембраны. Как отмечалось в четвертой главе, мембраны содержат огромное разнообразие липидов [69], существенное влияние на структуру мембран оказывают интегральные белки и различные другие их компоненты, которые по-разному распределены в различных мембранных структурах и у разных организмов. На структуру мембран влияют и периферические белки, занимающие около половины их поверхности, причем их связь с мембраной может быть легко нарушена при различных слабых воздействиях (см. главу 5). И именно сложный характер распределения различных компонентов в мембранах должен быть особенно чувствительным к возможным его нарушениям при замораживании или высушивании, в отличие от простых систем, где большие эффекты, наблюдаемые, например, при высушивании, обуславливают возможность столь же больших эффектов и в обратном процессе, что в принципе позволяет рассчитывать на их обратимость. Соответственно, различия в составе и строении мембранных структур у разных организмов должны определять и различия в их чувствительности к процессам замораживания и высушивания.

Существование значительных различий в структуре и устойчивости мембран разных организмов к замораживанию и к высушиванию следует уже из тех данных, что наряду с высокой чувствительностью одних видов мембран, например к высушиванию, мембраны других организмов выполняют прямо противоположную — защитную — функцию. Последнее явление наблюдается, прежде всего, у форм, специально предназначенных для переживания неблагоприятных условий, — спор микроорганизмов, семян растений и т. д. В частности, в спорах бактерий имеется область, занимающая около 40% их объема, куда вода извне не проникает, вплоть до начала прорастания спор [350]. При этом в сердцевине спор — их протопласте — остается около 20% воды [115], т. е. полное обезвоживание протопласта не происходит. В семенах растений, наряду с дестабилизацией мембран у части клеток в процессе высушивания, мембраны других клеток становятся слабопроницаемыми для воды при низкой влажности и, как отмечалось в главе 6, например, семена пшеницы способны удерживать более 10% относительно подвижной воды, извлечение которой связано со значительными трудностями.

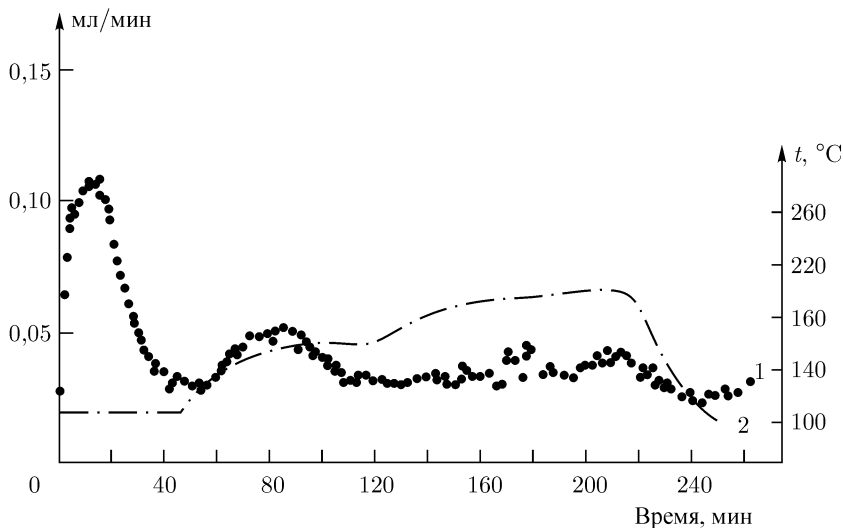


Рис. 42. Скорость выделения воды из клеток лиофилизированной биомассы дрожжей *Cryptococcus albidus var diffluens* в зависимости от температуры и времени нагрева в токе сухого азота: 1 — скорость расхода реактива Фишера, соответствующая количеству выделившейся воды, 2 — температура образца, °C [35]

Низкая проницаемость мембран была подтверждена и данными по существенному замедлению в поступлении тяжелой воды в клетки семян пшеницы, где ее смешивание с находящейся в них обычной водой происходит лишь после постепенного восстановления нормальной проницаемости [32] (см. главу 6).

Низкая проницаемость клеточных мембран семян растений, по-видимому, определяет и сохранение в них количества воды, заметно превышающего его равновесное значение при относительной влажности среды. Снижение влажности семян в процессе хранения коррелирует со снижением их жизнеспособности [30, 85], что, по-видимому, связано с постепенным нарушением барьерной функции мембран, которое может быть заметно ускорено при пребывании семян при высокой влажности и повышенных температурах [356].

Необходимость удержания некоторого количества воды, по крайней мере, в части клеточного объема у низших растений и эукариотных микроорганизмов (грибы, дрожжи, мхи и лишайники), для сохранения ими жизнеспособности после высушивания, следует также из данных по об-

наружению в них после стандартной сушки изолированной подвижной воды [7, 43, 45]. Исследования, выполненные с помощью метода спинного эха ЯМР с использованием изотопного замещения [43, 45, 177], данных прямого химического определения воды (рис. 42) [36], измерений коэффициента самодиффузии методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля [60] и других, показали, что среди изученных более чем 100 видов и штаммов дрожжей, одноклеточных грибов, лишайников и мхов все устойчивые к высушиванию образцы, в том числе среди разных штаммов одного вида дрожжей (см., например, рис. 43) сохраняют после высушивания в стандартных условиях от десятых долей процента до 30 % подвижной на молекулярном уровне воды [21, 34, 45]. У неустойчивых к высушиванию штаммов такая вода, как правило, отсутствует, тогда как исключения (рис. 44), возможно, связаны с другими причинами гибели. Следует также отметить, что после выделения из сохранившихся после высушивания отдельных клеток неустойчивых к высушиванию штаммов более устойчивых клонов их клетки уже обладали способностью сохранять в части своего объема подвижную воду (рис. 45 и 46) [34, 45].

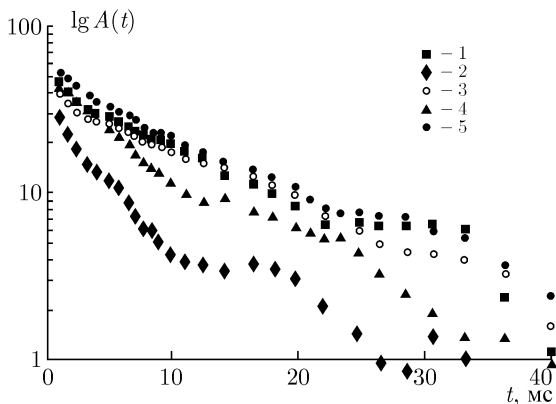


Рис. 43. Кривые спада спинного эха для протонов от высушенной биомассы пяти устойчивых к высушиванию штаммов дрожжей *Saccharomyces ludwigii*: 1 — шт. 640, 2 — шт. 631, 3 — шт. 638, 4 — шт. 631, 5 — шт. 639a [34]

Важно еще подчеркнуть, что количество остающейся в клетках эукариотов воды существенно зависит от фазы их роста. Дрожжи, замороженные на первых этапах их выхода из состояния покоя, сохраняют после высушивания в вакууме до нескольких процентов такой воды, то-

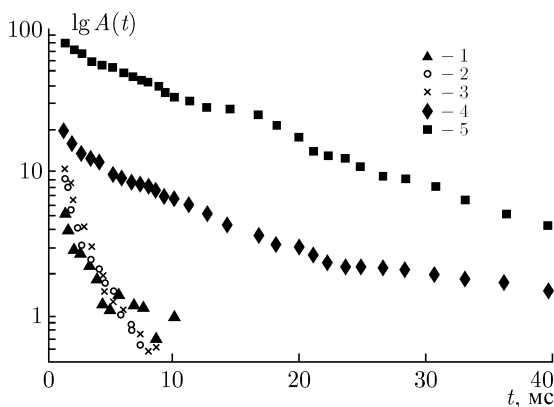


Рис. 44. Кривые спада спинного эха для протонов от высушенной биомассы пяти неустойчивых к высушиванию штаммов дрожжей *Saccharomyces ludwigii*: 1 — шт. 635, 2 — шт. 1194, 3 — шт. 642, 4 — шт. 643, 5 — шт. 639 [34]

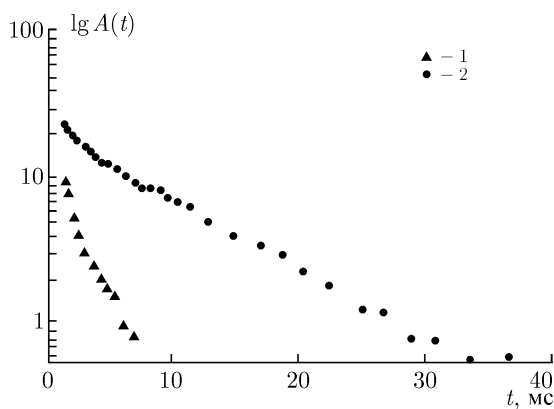


Рис. 45. Кривые спада спинного эха для протонов от высушенной биомассы дрожжей *Saccharomyces ludwigii*: 1 — неустойчивый к высушиванию штамм 1194, 2 — устойчивый к высушиванию клон, полученный из клеток, перенесших высушивание [34]

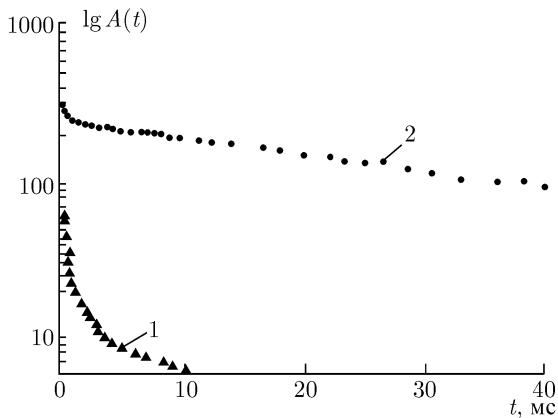


Рис. 46. Кривые спада спинного эха для протонов от высушенной биомассы дрожжей *Endomyces magnusii*: 1 — неустойчивый к высушиванию штамм, 2 — устойчивый к высушиванию клон

гда как их фиксация в логарифмической фазе роста вызывала падение количества оставшейся воды на порядок (рис. 47 [42]). Последнее коррелировало и с падением устойчивости взятых на этой фазе дрожжей к высушиванию. Замедление роста при переходе к стационарной фазе, в свою очередь, приводило к увеличению количества оставшейся воды в клетках дрожжей, хотя и до максимальной величины, отмеченной при их выходе из состояния покоя. Возвращение к исходным данным наблюдали лишь после помещения дрожжей в новую питательную среду, которая на первых этапах, по-видимому, оказывала стрессовое воздействие.

Сохранение подвижной на молекулярном уровне воды в клетках эукариотных микроорганизмов было объяснено ее изоляцией во внутриклеточных структурах, по-видимому, вследствие изменения проницаемости ограничивавших их мембран в процессе дегидратации. В результате подвижная вода оказывается внутри структур, полностью ограниченных липидным слоем, который вместе с другими компонентами мембран обеспечивает полную изоляцию ее и остального содержимого таких структур от воздействия высушивания, неводных растворителей и т. д. [45]. Извлечение изолированной подвижной воды становится возможным, как показали соответствующие эксперименты, либо при обмене с поступившей извне водой, которая восстанавливает проницаемость мембран, либо при разрушении ограничивающих водосодержащих

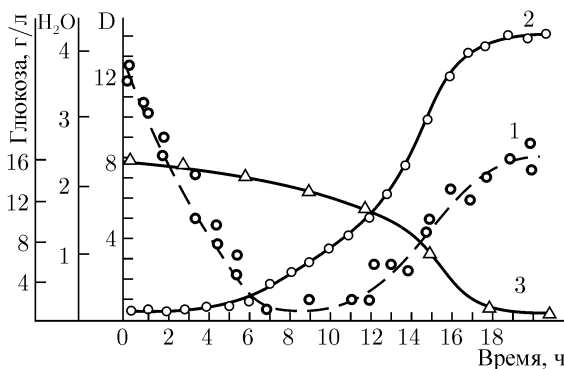


Рис. 47. Изменение содержания подвижной воды (1) в лиофилизированной биомассе дрожжей *Candida utilis* (% от массы высушенных дрожжей) в зависимости от фазы роста культуры (кривая 2, D — оптическая плотность) и потребления субстрата (3 — содержание глюкозы, г/л) [42]

объем структур, например при их нагреве до $120^{\circ}\text{--}180^{\circ}\text{C}$ в атмосфере сухого азота (рис. 42) [36].

Приведенные данные показывают, что необходимым условием для сохранения жизнеспособности клеток эукариотов, даже тех, которые по условиям своего существования подвергаются высушиванию, является удержание некоторого количества воды, по крайней мере в части клеточного объема у одноклеточных форм или в части клеток, например, у семян растений. Ведущую роль в удержании этой воды, по-видимому, играет изменение проницаемости клеточных или внутриклеточных мембран.

Биологическая роль изолированной подвижной воды в высушенных низших растениях, возможно, связана с необходимостью избежать нежелательного увеличения концентрации солей в ходе высушивания. Уже отмечалось, что устойчивые к высушиванию виды лишайников сохраняют значительно меньше калия по сравнению с неустойчивыми видами [271]. В то же время для таких видов, как криптококки, обитающих в высокогорных пустынях Восточного Памира с резкими колебаниями (в противофазе) температуры и влажности, сохранение до 30 % воды [21, 262], возможно, служит механизмом приспособления к таким колебаниям с разделением условий для сбора влаги ночью для ее сохранения при более благоприятных для функционирования дневных температурах [45].

Еще одна из вероятных причин чувствительности клеток к потере воды сверх некоторого предела — возможность нарушения состояния сложных многокомпонентных систем, к которым относятся биологические мембраны, и тем более клетки в целом. Там, где высушивание приводит к относительно большим разностным эффектам, такие же большие эффекты возникают и в обратном процессе — при увлажнении, что может способствовать восстановлению систем, нарушенных при высушивании. В случае же малого выигрыша свободной энергии при восстановлении многокомпонентной системы в пределах биологических мембран или клетки в целом задача становится столь же трудно решаемой, как задача ренатурации белка после его полного разворачивания.

Примером подобной сложной многокомпонентной структуры в пределах мембран является система электронного транспорта в цепи фотосинтеза. Если состояние отдельных участков цепи фотосинтеза (в частности, рассмотренных в главе 4) в значительной степени обратимо после воздействия высушивания и последующего увлажнения, то для цепи в целом, зависящей от согласования между собой большого числа компонентов, это наблюдается далеко не всегда. Так в процессе высушивания клеток хлореллы при достижении ими влажности около 20% резко возрастает замедленная флуоресценция хлорофилла [146], что связано с разрывом цепи фотосинтетического электронного транспорта из-за нарушения структуры мембран. Такие нарушения, по-видимому, носят необратимый характер, поскольку возрастанию флуоресценции хлорофилла соответствует гибель клеток хлореллы в ходе высушивания.

Следовательно, биологические мембраны как сложные многокомпонентные образования весьма чувствительны не только к механическим воздействиям и температурно-осмотическому шоку [66], но и к нарушению равновесия сил в пределах мембран, возникающему и в процессе высушивания, на определенных его этапах, и в ходе замораживания. При этом чувствительность мембран к подобным воздействиям существенно зависит от степени сложности их организации, заметно отличающейся у различных форм жизни, а также от функционального состояния мембранных структур и клетки в целом.

8.4. Эффекты на клеточном уровне

Еще более чувствительной системой, позволяющей, с одной стороны, управлять метаболическими процессами в клетке на основе слабых воздействий, а с другой — по той же причине реагировать на различные относительно слабые повреждающие воздействия, связанные с процесса-

ми замораживания или высушивания, является распределение водорастворимых белков в пределах клетки между свободными и иммобилизованными состояниями. Чувствительность такой системы должна особенно сильно зависеть от функционального состояния клеточных структур, а степень ее изменения, вероятно, будет определять обратимость или необратимость возникших нарушений.

Здесь речь идет не обязательно о повреждающих воздействиях, хотя сорбция основной массы водорастворимых белков на мембранах и других клеточных структурах должна, естественно, привести к упрочнению тех и других. В этом, по-видимому, одна из причин более высокой устойчивости покоящихся организмов к замораживанию и к высушиванию по сравнению с функционально активными (см., например, рис. 47). Но необратимость будет возникать и без повреждения самих структур при случайном расположении большого числа компонентов, взаимодействующих между собой в водном растворе, причем воздействия, необходимые для перехода этих компонентов в воду также зависят от функционального состояния клетки. Здесь следует упомянуть, что по данным измерений микровязкости в клетках, ее заметное повышение при различных воздействиях, которое мы относим к эффектам высвобождения белков из связанного состояния (см. главу 5), приводит к необратимым изменениям в клетке [58]. С другой стороны, повышение прочности связи периферических белков с мембраной при переходе организма в состояние покоя за счет действия биологически активных веществ, изменения липидного и иного состава мембран, а в отдельных случаях и ионного состава цитоплазмы — при переходе ежей к зимней спячке у них в 2–3 раза увеличивает содержание конкурирующего с ионами Ca^{2+} магния в цитоплазме [96] — должно увеличивать их устойчивость к повышению ионной силы и к другим эффектам, сопряженным с воздействием замораживания и высушивания.

Приведенные выше данные еще раз подтверждают, что нельзя ограничиваться учетом изменения состояния лишь водной составляющей клеток в ходе замораживания или высушивания, причем вероятность необратимости возникших нарушений тем выше, чем большее число разных компонентов включает клетка. Низкая устойчивость сложно организованных биологических систем является обратной стороной их высокой чувствительности к управляющим воздействиям и их более высокой избирательности по сравнению с более просто организованными системами. Соответственно, снижение метаболической активности в клетках вызывает повышение устойчивости клеточных структур и клеток в целом в возможном повреждающим воздействиям замораживания или высушивания.

И если равновесие в пределах нормального функционирующих клеток млекопитающих может быть нарушено уже при потере 20–30 % воды, приводя к их гибели, то при предшествующем выдерживании клеток при пониженных температурах, резко снижающем интенсивность метаболизма, существенно увеличивается устойчивость таких клеток к воздействию замораживания [108]. И дело здесь не просто в предотвращении льдообразования, так как добавление защитных сред может привести и к обратному ожидаемому результату — снижению выживаемости организмов, если введение таких сред одновременно стимулирует метаболическую активность [200].

Таким образом, удаление воды или ее вымораживание в клетках приводит к существенному смещению равновесия сил к новому значению, которое, в конечном счете, должно сделать биологические структуры более устойчивыми, но неспособными к выполнению своих биологических функций. В процессе перехода к этому равновесному устойчивому значению возможны не всегда обратимые нарушения структуры, чувствительность к которым заметно отличается на разных уровнях организации биологических систем, особенно увеличиваясь на клеточном уровне. Именно этот последний фактор, по-видимому, и вносит наибольшие затруднения в использование процессов замораживания и высушивания для сохранения высокоорганизованных форм жизни и их отдельных органов и тканей. Здесь обратимость или необратимость возвращения к организованному расположению различных компонентов в пределах клетки должна весьма существенно зависеть от количества возникших нарушений и определяемого ими числа возможных вариантов их распределения.

Последний вопрос, на котором следует остановиться в связи с обсуждаемой здесь ролью воды, возможности метаболических реакций при пониженных температурах и низкой влажности. Значительное смещение равновесия в пределах различных биологических структур позволяет отвергнуть возможность нормального метаболизма в них после замораживания или высушивания, несмотря на то, что отдельные каталитические реакции с участием некоторых ферментов наблюдались вплоть до -30°C [161] и при относительной влажности P/P_0 более 0,3 [208]. Однако, как уже отмечалось, существуют большие различия между способностью к катализу и возможностью его регулирования, а тем более, согласования с другими проходящими в организме реакциями. Анализ особенностей биохимической адаптации показал, что «поддержанию регуляторной функции отдается предпочтение перед простой способностью катализировать какую-либо реакцию с исключительно высокой скоростью» [234]. Но это не исключает возможности прохождения отдельных практически не регулируемых реакций при не слишком низких значени-

ях температуры и влажности, для которых, вместе с тем, должны существовать определенные ограничения в поступлении субстрата и продуктов биохимических реакций.

Указанному выводу не противоречат данные по прохождению нормальных метаболических реакций на начальных этапах набухания и конечных этапах созревания семян растений при общей их влажности, в несколько раз меньшей, чем в других активно функционирующих биологических объектах. Как уже отмечалось в главе 6, исследования, выполненные с помощью методов спинного эха ЯМР и ЭПР-томографии, показали, что вода в семенах злаков на начальных этапах набухания и конечных этапах созревания распределена гетерогенно и что при общем низком содержании воды в семенах пшеницы и риса в них присутствует вода в жидкой фазе.

Наличие ограничений для прохождения нормальных метаболических реакций и, соответственно, процессов репарации в организмах при низкой температуре и влажности будет ограничивать и время их жизни из-за постепенного накопления все большего числа повреждений. И хотя при низких температурах практически можно пренебречь воздействием энергии теплового возбуждения, остается проникающая радиация, которой даже при небольших потоках нельзя пренебречь, если речь идет о многих миллионах лет. В случае же хранения высушенных организмов при обычных температурах предельное время их жизни, как отмечалось, не должно превышать 10^4 – 10^5 лет [11]. И, следовательно, несмотря на значительное повышение устойчивости биологических структур при замораживании воды или при ее удалении время жизни таких структур в конечном счете оказывается заметно меньшим, чем время жизни биологических структур, менее устойчивых в присутствии воды, но зато способных к репарации и последующему воспроизводству.

ГЛАВА 9

Процессы регуляции и надежность биологических систем

9.1. Введение

Как уже отмечалось, длительное существование биологических структур не может быть обеспечено их прочностью или химической стойкостью, которые в данном случае имеют ограниченный характер. Энергия тепловых флуктуаций даже при обычных температурах среды вызывает рацемизацию и распад ряда аминокислот [114], депуринизацию нуклеотидов [88, 90] и т. д. В результате время жизни этих аминокислот, например, в геологических отложениях ограничено до 10^5 – 10^7 лет [114], что в случае макромолекул биополимеров, чувствительных уже к отдельным изменениям в их составе, должно быть сокращено на 2–3 порядка. Ограничена и продолжительность анабиоза при тех же температурах [11]. И хотя любые системы имеют лишь ограниченное время жизни, для живых систем вероятность их спонтанного возникновения ничтожно мала не только в указанные, но и на много порядков большие времена. Поэтому длительное существование любых биологических структур практически полностью определяется возможностью их воспроизводства в процессах биосинтеза, причем в течение многих поколений. А это предъявляет весьма жесткие требования к надежности работы систем, обеспечивающих эффективность таких процессов и особенно процессов регуляции, чувствительность которых к разнообразным слабым воздействиям делает их уязвимыми и к различного рода помехам. Поэтому рассмотрение механизмов, используемых живыми системами для своего длительного существования при воздействии многообразных помех имеет не только фундаментальное научное, но и прямое практическое значение, в том числе для медицины, сельского хозяйства и экологии. Следует отметить и возросший в последние годы интерес к подобным вопросам в связи с попытками получения клонированных организмов.

Воспроизводство живых систем зависит от эффективности работы регуляторных процессов, основанных на наличии у биологических

структур чувствительности к слабым воздействиям. Важно обеспечить и некоторую прочность структур, необходимую для их самоорганизации и сохранения в течение некоторого срока, что приводит к гетерогенности их состава. Необходимо также уменьшить роль ошибок биосинтеза, неизбежных в любом процессе, либо путем снижения их вероятности, либо путем коррекции ошибок. Все такие требования оказалось возможным совместить не на основе дополнительного роста прочности биологических структур, а на основе их высокой чувствительности к слабым регуляторным воздействиям, что прослеживается на всех уровнях организации биологических систем.

9.2. Процессы регуляции и особенности биосинтеза белков

На уровне белков чувствительность к регуляции, как уже отмечалось, достигается на основе равновесия сил в пределах макромолекул, наблюдаемого в водной среде. Отражением равновесия сил в воде является динамическая структура белков, которые для самоорганизации и сохранения своей устойчивости содержат также более жестко связанные участки (см. главу 3). Наличие достаточно протяженных зародышей структуры (при участии и других факторов), по-видимому, необходимо для формирования и более слабо связанных участков, что, с учетом большой поверхности их связи с зародышами структуры, должно давать заметный выигрыш свободной энергии. Вместе с тем, та же динамическая структура белков позволяет проводить коррекцию ошибок, возникающих при биосинтезе или при искажении их структуры в ходе функционирования. Вероятность возникновения ошибки при биосинтезе белков оценивается как 10^{-4} [235]. Для повышения точности работы такой системы на порядок, если исходить из данных по повышению отношения сигнал/шум, необходимо на 2 порядка удлинить время ее работы. По-видимому, более эффективной оказалась коррекция возникших ошибок за счет протеолитических ферментов [62], специфически воздействующих на связи между определенными парами аминокислот, которые обычно находятся внутри белковой глобулы. Эти связи эпизодически доступны для протеолиза при нарушениях или при относительно больших флуктуациях структуры [343], ограничивая таким образом время жизни данных белков в клетке. Изменение структуры белка при биосинтезе обычно резко увеличивает скорость протеолиза, что снижает вероятность нежелательного для организма изменения структуры. Дополнительный контроль за работой таких систем осуществляет также иммунная система у животных организмов [183].

Тем не менее, все это, как известно, не гарантирует появления тех или иных искажений в структуре белков, которые при условии их согласования с работой других систем, могут воспроизводиться и дальше. Если же такое согласование отсутствует, то это будет приводить к гибели лишь конкретных организмов, а не их популяции в целом, которая и в этом случае сохраняет устойчивость в течение ряда поколений.

9.3. О динамическом характере устойчивости ДНК

Более сложной оказалась задача обеспечения надежности функционирования ДНК. Если случайные нарушения при синтезе белков, не устраняемые в самом процессе синтеза, могут быть в основном ликвидированы за счет протеолиза, то нарушения, возникшие в ДНК, будут воспроизводиться постоянно. Поэтому в организмах используются различные пути повышения надежности сохранения ДНК, начиная от условий упаковки макромолекул ДНК и кончая различными системами репарации и наличием двойного набора ДНК в клетках диплоидных форм [137].

Однако не все повреждения наследственного аппарата могут быть исправлены [117, 88, 90] и, кроме того, ни одна система не работает без ошибок с абсолютной точностью. В результате с большей или меньшей скоростью со временем происходит накопление повреждений, которые постепенно будут все более затруднять функционирование организма, приводя к его гибели. Если же клетка или вирусная частица успели воспроизвести себя ранее, чем в них возникли летальные изменения, то, с учетом случайного характера появления повреждений, какая-то часть популяции все же останется способной к воспроизводству. При этом появление повреждений существенно зависит от длины макромолекул ДНК, особенностей их упаковки, числа макромолекул ДНК в клетке, эффективности работы репарирующих систем и т. д. Использование данных систем в конечном счете позволяет повысить устойчивость ДНК к повреждающим факторам, в частности к ионизирующей радиации, в целом примерно на 3 порядка по сравнению с однокитовой ДНК [137].

Но содержание и длина ДНК у форм жизни с различным уровнем организации отличается в крайних случаях примерно на 6 порядков. Естественно, что при малой длине макромолекулы, сопоставимой по числу нуклеотидов с величиной, обратной числу случаев повреждения ДНК или РНК, доля организмов с неизмененным геномом будет довольно большой. Тогда для устойчивости системы в целом достаточно обеспечить превышение общего числа воспроизведенных организмов

с нужными характеристиками над количеством погибших за тот же интервал времени. Но данный случай, по-видимому, имеет место только для вирусов, которые к тому же зависят в своем воспроизводстве от других организмов и согласования с ними своих наследственных характеристик. Во всех других системах ситуация с устойчивостью является более сложной, и именно неустойчивость отдельных макромолекул ДНК в течение ряда поколений, вероятно, определяет известные ограничения на общее число делений одной клетки. Поэтому, начиная с определенного уровня организации, различные формы жизни используют и другие способы поддержания длительности своего существования, которые необходимо обсудить для выяснения вытекающих отсюда последствий.

Основной формой поддержания устойчивости генома в условиях действия различных помех, помимо систем репарации, очевидно, является обмен генетическим материалом между разными организмами одного вида. Известно, что макромолекула ДНК человека содержит около 3×10^9 нуклеотидов [56]. Учитывая случайный характер появления повреждений в различных участках макромолекулы ДНК у каждого из организмов и принимая вероятность такого повреждения равной 10^{-6} , получим, что вероятность совпадения поврежденных участков для одиночных наборов ДНК, содержащихся в половых клетках, составит 10^{-12} (если не учитывать действие различных других помех). В принципе, это позволяет рассчитывать на возможность устранения практически всех возникших повреждений. И в результате данный фактор определяет устойчивость сообщества организмов в течение многих поколений, хотя обычно с подобным обменом связывали, прежде всего, возможность включения и передачи потомству нового генетического материала [56]. И лишь в последние десятилетия внимание было обращено на ряд не учитываемых ранее генетиками фактов. Так, например, было отмечено заметное уменьшение жизнеспособности и увеличение изменчивости популяции шелкопряда при андрогенетическом и партеногенетическом способах его размножения по сравнению с половым путем [224]. В то же время в опытах на шелкопряде и дрозофиле было показано, что скрещивание между собой в пределах одной популяции особей с низкой жизнеспособностью, обусловленной наличием у них различных полуплетальных генов, позволяет, за счет эффектов погашения различных полуплеталей, резко повысить выживаемость полученного от них потомства [222, 223].

Следовательно, устойчивость ДНК, как и устойчивость других биологических структур, имеет не статический, за счет своей высокой прочности, а динамический характер и определяется уже не только воспроизводством в пределах отдельных систем, но также погашением возникших ошибок или повреждений за счет обмена генетическим

материалом в пределах популяции в целом. И опять, как в случае белков, из-за невозможности полного устранения ошибок, уменьшение их отрицательных эффектов достигается не повышением прочности системы, а введением поправок путем элиминирования уже не измененных белков, как в клетке, а особей с низкой жизнеспособностью из данной популяции. Это позволяет существенно повысить надежность работы таких систем и в целом обеспечить их воспроизводство в течение многих поколений.

Учет такого рода факторов позволяет объяснить большое число различных явлений и, в частности, решить противоречие между высокой изменчивостью, например, культур микроорганизмов в процессе их культивирования и сохранением основных характеристик таких микроорганизмов в природе в течение весьма длительных сроков. Обмен в пределах большой популяции делает ее очень устойчивой, но мало изменяемой, тогда как вероятность появления каких-либо изменений в небольшой популяции будет выше, но эта же популяция станет менее устойчивой на протяжении больших интервалов времени.

Другой пример: эффекты погашения ошибок в макромолекулах ДНК делают потомство более жизнеспособным в будущем по сравнению со своими родителями. Учитывая случайный характер ошибок в исходных макромолекулах ДНК и их возможных сочетаний, результат которых нельзя предсказать заранее, в потомстве должно наблюдаться некоторое распределение свойств. При этом возможность более полной компенсации нарушений в структуре при взаимодействии двух X-хромосом по сравнению с взаимодействием X- и Y-хромосом делает потомство женского пола более устойчивым, но менее изменчивым по сравнению с потомством мужского пола, для которого, как известно, отмечается более широкое распределение различных свойств. Эти факты находятся в соответствии с высказанным в свое время мнением, что мужчины представляют своеобразный пробный камень эволюции [97].

В подобном процессе наибольшую опасность представляют общие повреждения. С этой точки зрения следует рассмотреть данные о формировании первичных зародышевых клеток у человека уже к 20-й неделе эмбрионального развития [56, 188], когда успевает накопиться лишь минимальное число общих ошибок. В дальнейшем же в каждой из них происходят свои, не совпадающие с другими зародышевыми клетками, изменения. С тех же позиций следует отметить и необходимость формирования в зародыше женского пола в течение первых нескольких месяцев 7 млн. половых клеток, подавляющее большинство которых в дальнейшем дегенерирует, вероятно, вследствие накопления большего или меньшего числа различных повреждений макромолекул ДНК. В то же время у мужчин каждый гаплоидный спермий имеет со своими соседя-

ми общую цитоплазму и может получать весь набор продуктов полного диплоидного генома [56].

Большое количество нуклеотидов, содержащихся в ДНК многоклеточных организмов, обуславливают и большое число изменений в их структуре в ходе развития организмов и, соответственно, необходимость погашения таких изменений в каждом последующем поколении. Для микроорганизмов подобная необходимость, по-видимому, возникает лишь через несколько поколений, когда становится невозможным их дальнейшее размножение без обмена генетическим материалом с другими клетками тех же микроорганизмов. Именно накопление повреждений, а не пресловутая запрограммированность клеток на гибель после определенного числа делений, по-видимому, ограничивает процесс дальнейшего размножения клеток, который к тому же сильно зависит от действия на них различных повреждающих факторов, в частности ионизирующей радиации, и может тогда прерваться уже через несколько делений.

9.4. О двойственной роли иммунной системы

Изменения в структуре ДНК со временем, несомненно, происходят и в соматических клетках многоклеточных организмов, эффект которых заметно ослабляется наличием в них двойного набора ДНК. Тем не менее, подобные изменения отчетливо наблюдаются в культуре тканей, для которых характерна определенная генетическая неустойчивость [81]. Такие изменения постоянно происходят также непосредственно в организме животных, в том числе у человека, где всегда присутствует некоторое количество «дефектных» клеток [183]. Наличие таких клеток может привести к некоторым нарушениям в работе организма животных, все структуры которого должны быть строго согласованы между собой.

Устранение возникших нарушений является, как известно, задачей существующей у животных иммунной системы, воздействующей не только на чужие, но и на свои измененные клетки. Пока происходит рост организма, нормальные клетки делятся без препятствий, а дефектные — замедленно, из-за торможения их роста иммунной системой, что обуславливает в целом их низкое содержание. С возрастом число изменений в геноме клеток обычно растет, но доля таких клеток со временем колеблется из-за наличия противодействующего процесса — работы иммунной системы, эффективность которой зависит от конкретного состояния организма. Существование такого двойственного процесса, по-видимому, обуславливает наличие длительного лаг-периода в его развитии. Но возникшее равновесие может быть нарушено за счет либо обще-

го ослабления иммунной системы, либо при ее временном ослаблении вследствие какого-либо неблагоприятного внешнего воздействия. Такой процесс, учитывая возможность экспоненциального роста числа измененных клеток, может привести к увеличению доли дефектных клеток до значений, уже не контролируемых организмом, и, соответственно, к быстрому развитию патологического процесса, реально наблюдаемого в действительности.

Но существует и другая возможность, связанная с эффективной работой иммунной системы. Поскольку число измененных (дефектных) клеток со временем все более растет, то в конце концов должен наступать такой момент, когда скорость их элиминирования при эффективной работе иммунной системы превысит прирост числа клеток за счет новых делений. В результате иммунная система в конечном счете «съест» сам организм.

Следовательно, в обоих случаях речь идет о наличии между различными процессами тонкого равновесия, нарушение которого с течением времени рано или поздно неизбежно приводит к гибели организма. К сожалению, никакие достижения науки не в состоянии обеспечить бессмертие отдельного человека. Можно лишь удлинить его жизнь за счет разумного корректирования возникающих нарушений в ту или иную сторону. Но при этом необходимо учитывать, что само равновесие в пределах организма — также непостоянная величина и оно постоянно согласуется с происходящими в нем изменениями отдельных компонент такого равновесия. В результате, например, попытки активировать работу иммунной системы в старости за счет костного мозга, взятого у данного человека в молодости, как и другие попытки «омоложения», по-видимому, могут привести лишь ко временному улучшению, а в дальнейшем к еще большему ускорению процесса старения.

9.5. Об эффектах клонирования

Динамический характер устойчивости ДНК необходимо учитывать и при обсуждении результатов клонирования организмов с целью получения абсолютно идентичных копий организмов. Изменения, происходящие в ДНК организма со временем, должны проявляться и в результатах клонирования. Уже первые опыты свидетельствовали о зависимости успехов в пересадке ядра от возраста взятой соматической клетки [6]. Проведенные в последующем опыты по клонированию животных оказались успешными лишь для единиц из многих десятков и сотен взятых для пересадки клеток животных. К тому же полученные клоны оказались отягощенными различными заболеваниями. Учет данных, а также

рассмотренных выше факторов не позволяет рассчитывать в дальнейшем на получение полных генетических копий, например, для пересадки органов или для воспроизводства животных с исключительно высокими хозяйственными свойствами.

Представления о неустойчивости структуры ДНК не противоречат и имеющимся данным для растительных объектов, несмотря на существование у них вегетативного способа размножения. Но, как уже отмечалось, в культуре растительных тканей наблюдается относительно быстрое расхождение их свойств [81, 106]. Неустойчивыми являются и вегетативные формы, хотя между ними имеются и существенные различия. Вместе с тем известно, что в отличие от клеток животных, где содержание ДНК является постоянной величиной для определенного вида, у цветковых растений количество ДНК в клетках меняется в довольно широких пределах [106], и, возможно, именно этот фактор и определяет наблюдаемые различия в устойчивости генетического аппарата разных форм растений.

Кроме того, в растениях, как известно, отсутствует активная иммунная система, которая могла бы воздействовать на клетки с измененными характеристиками, что позволяет им развиваться самостоятельно, даже при наличии значительных отклонений от нормы — достаточно напомнить о широком использовании данного свойства при прививках растений. Если же в результате возникших изменений в клетках и их геноме они становятся нежизнеспособными, то это отражается практически лишь на самих таких клетках, а не на организме в целом. Поэтому даже в благоприятных условиях среды со временем должно происходить отмирание отдельных участков многолетних растений, тогда как другие будут продолжать свой рост. Но и их свойства, по-видимому, не остаются неизменными в течение длительного интервала времени, что в общем соответствует известным данным.

Таким образом, представления о невозможности длительного сохранения устойчивости ДНК в отдельных клетках, даже с учетом процессов репарации ДНК и необходимости в связи с этим обмена генетическим материалом между разными организмами одной популяции, позволяют с единой точки зрения объяснить большое число самых разнородных фактов. Не менее важно, что наличие подобного обмена, наряду со стабилизацией генома, одновременно обеспечивает условия для существования организмов в постоянно меняющейся внешней среде. Как и в рассмотренных ранее случаях, сочетание столь противоречивых свойств генетического аппарата предоставляет эффективные возможности для решения самых различных противоречивых задач, с которыми постоянно встречаются организмы. И здесь многократно возникают ситуации, когда однозначное решение становится невоз-

возможным, и в каждом случае приходится искать и находить оптимальный ответ.

Характерным примером подобного положения является возможность использования различий в устойчивости макромолекул ДНК к внешним воздействиям в виде одиночной нити и упакованных в хромосомы. С одной стороны, упаковка в хромосомы повышает устойчивость к ионизирующей радиации на два порядка [137], но с другой, тогда не работают процессы репарации, которые могли бы восстановить возникающие повреждения. Поэтому оптимальным решением может быть попеременное пребывание ДНК в покоящемся и функционально активном состояниях, соотношение между которыми будет определяться условиями внешних воздействий. И если, например, радиационные условия являются определяющими для существования организмов, то те из них, которые смогли найти такой оптимум, имели бы преимущество перед всеми остальными. В подобной же ситуации необходимость поиска оптимального решения возникает и в случае наличия гаплоидных и диплоидных форм одного организма. Хотя двойной набор ДНК увеличивает устойчивость генома, но с его наличием сопряжены дополнительные затраты, которые могут быть выгодными или невыгодными в зависимости от внешних условий, равно как и от скорости изменения таких условий, когда дополнительная стойкость ДНК может оказаться препятствием для приспособления организма к новым, изменившимся условиям среды.

В целом рассматриваемые различные механизмы поддержания устойчивости ДНК предоставляют весьма широкие возможности для существования организмов в постоянно меняющихся условиях внешней среды и для активного приспособления к подобным условиям. Сочетание изменчивости отдельных макромолекул ДНК и обмена генетическим материалом между различными организмами одной популяции приводит к расхождению генетических характеристик организмов, но, одновременно, к стабилизации их около некоторой усредненной величины. При этом каждый достаточно высокоорганизованный организм популяции, по-видимому, имеет свой, присущий только ему набор способных к функционированию генов, определяемый чисто вероятностными законами. Как отметил В. А. Струвников: «Формирование каждого организма и его органов не выполняется в строгом соответствии с его генотипом. Эти отступления или ошибки у генетически одинаковых особей одной популяции в одной среде носят вероятностный или чисто случайный характер. Частота отступлений от генотипа находится в обратной зависимости от жизнеспособности» [223].

Подобные различия наблюдаются и у человека, когда дети одних родителей отличаются весьма заметно. Предпосылки этому, очевидно, создает самостоятельное развитие первичных зародышевых клеток, кото-

рые у их родителей, как отмечалось, во избежание общих повреждений были заложены еще в эмбриональном периоде. И здесь, как и в других случаях, получение того или иного сочетания свойств потомства определяется чисто вероятностными законами, если только исходно у родителей, например из-за близкого родства, не были заложены общие повреждения уже заранее. Последнее находится в соответствии с хорошо известными данными о возможности в этом случае генетического вырождения.

Наличие широкого набора генотипов в пределах одной популяции уже исходно делает ее более устойчивой к заметному изменению условий внешней среды. Пока такие условия допускали существование всего набора генотипов, популяция стабилизируется около некоторой усредненной величины, и эволюция в этих условиях является замедленной. Вымирание части популяции в изменившихся условиях среды одновременно приводит к отсутствию вклада от нее в общий генофонд популяции с соответствующим относительно быстрым смещением для него усредненного набора генов и наблюдаемым в таком случае ускорением темпов эволюции. Такие же условия возникают и при изоляции части популяции. Но та же новая популяция становится менее устойчивой к возможным изменениям условий в ту или иную сторону.

Все перечисленные результаты находятся в полном соответствии с известными данными по особенностям процесса эволюции [104].

9.6. О «нейтралистской» теории эволюции

Динамический характер устойчивости ДНК проявляется и на уровне популяции, биоценоза и биосферы в целом. В этой связи следует остановиться на предпосылках и на особенностях появления молекулярной, или так называемой нейтралистской, эволюции [129]. Не отрицая возможности спонтанного изменения молекулярной структуры биологических макромолекул, которое относительно мало сказывается на выполнении ими своих функций, необходимо заметить, что представления о нейтралистском характере замен, например отдельных аминокислот в белках, не объясняют, почему такие замены должны происходить у всех организмов данного вида. Вместе с тем известно, что каждому виду организмов присущи свои болезни, вызываемые патогенными микроорганизмами или вирусами, ряд которых избирательно действует только на эти организмы или, в меньшей степени, на организмы близкого вида [183, 211]. Известно также, что помещение в одном месте больших групп животных одной породы делает их неустойчивыми к возможной вспышке болезни у одного из этих животных и к ее быстрому распро-

странению среди остальных. И дело здесь не только в дефектах активного иммунитета, так как подобный же случай может наблюдаться, например, и при наличии больших площадей, занятых односортовыми посевами зерновых, у которых вообще нет иммунной системы.

В то же время для любых организмов жизненно необходимой является проблема их защиты от различных инфекций, которую и при отсутствии специализированной иммунной системы, у всех организмов, начиная с бактерий, выполняет так называемый конституциональный иммунитет [211]. Конституциональный иммунитет не осуществляет активной борьбы с носителями различных заболеваний, а защищает организм или отдельные клетки от проникновения в них чужеродных микроорганизмов и вирусов, исключая специфически патогенные для данных организмов формы, которые сами или их токсические продукты в результате длительного совместного развития выработали способность к проникновению в клетки «хозяина» и к взаимодействию с его некоторыми структурами. Такого рода способность обусловлена наличием определенного соответствия между отдельными структурами клеток «хозяина» и данного патогенного фактора. В частности, дифтерийный токсин и холерный токсин связываются каждый со своим специфическим рецепторным участком клеточной мембраны, что создает предпосылки для их проникновения в клетку [78, 211]. Наличие таких рецепторных участков на поверхности мембран у одних организмов и отсутствие или их видоизменение у других должны влиять на чувствительность тех или других организмов к данному токсическому фактору, независимо от присутствия других систем иммунитета. Подобные же изменения будут возникать уже при замене отдельных аминокислот в белке, с которым осуществляется данное взаимодействие. Известно, что малярийный плазмодий обладает способностью к разрушению обычного гемоглобина человека, с чем и связаны эффекты самого заболевания. Но уже замена одной аминокислоты в гемоглобине, которая ведет к другому заболеванию — серповидно-клеточной анемии, встречающемуся в местах с широким распространением малярии, — делает гемоглобин нечувствительным к воздействию плазмодия [211].

Известно также, что в местах широкого распространения определенных заболеваний выживают практически лишь те формы растений, которые смогли выработать какие-то изменения в своей структуре, делающие их нечувствительными к таким заболеваниям, причем наряду с этими растениями существуют и слабопатогенные для них формы микроорганизмов или вирусов. Но эти же формы часто оказываются патогенными для растений из других зон обитания, что приводит либо к их гибели, либо к выделению из таких растений видоизмененных клонов,

устойчивых к данному заболеванию. Изменения происходят и с другой стороны, путем появления из авирулентных форм патогенов с измененной структурой и свойствами. В литературе имеется множество примеров такого рода, относящихся именно к конституциональному иммунитету [211, 78].

Происходящие в подобных процессах структурные изменения, в том числе за счет аминокислотных замен в макромолекулах белков, очевидно, не являются нейтральными и даже могут приводить к ухудшению функциональных характеристик, как в случае серповидно-клеточной анемии, если иной путь выживания невозможен или затруднен. Изменение аминокислотного состава определенных белков или иных структурных характеристик данного организма по сравнению с организмами другого вида, по-видимому, должно приводить к повышению его устойчивости к специфическим для другого вида заболеваниям. Если же допустить, что различий в составе нет, то заболевание одного чувствительного организма вызвало бы заболевание всех его соседей и эпидемия превратилась бы во всеобщую пандемию. Вместе с тем, в действительности существование различий в составе, причем не только между видами и родами, но и по соотношению тех или иных компонентов также в пределах одного вида, позволяет разорвать эту цепь. В результате процесс обычно принимает такой характер, при котором сохраняются представители обеих взаимодействующих форм, хотя их численность может значительно колебаться.

Наличие заметных различий по целому набору разных компонентов практически между всеми представителями одного вида, в данном случае у человека, следует уже из существования реакций отторжения при пересадках органов. Возможность столь большого числа наблюдаемых при этом различий вполне объясняется за счет отличий в соотношении между отдельными элементами структуры, где количество вариантов практически безгранично.

Таким образом, динамический характер устойчивости ДНК, наряду с возможностью вариабельности структуры макромолекул ДНК, не только достаточны, но и обязательны для длительного существования различных организмов в изменяющейся среде и при их взаимодействии с другими формами жизни. Более того, подобная система предоставляет весьма широкие возможности для изменения в зависимости от условий среды, соотношения между устойчивостью и изменчивостью ДНК и ускорения процесса эволюции при неблагоприятных — или замедления при благоприятных — условиях среды. И в случае ДНК, как и на всех рассмотренных выше уровнях организации биологических систем, устойчивость имеет одну и ту же природу, определяемую не статической прочностью структур, а возможностью обеспечения динамического

характера происходящих при этом процессов. И здесь, как и всюду, решающее значение имеют поиски равновесия, которое не является постоянной величиной, а в каждом случае должно определяться живыми системами в зависимости от особенностей своего строения и конкретных условий окружающей среды.

Заключение

Приведенные выше данные показывают, что представления о регуляторной роли воды в биологических системах находят непосредственное подтверждение при изучении особенностей воздействия воды на состояние и функциональные характеристики разнообразных биологических структур, начиная от макромолекул белков, биологических мембран и кончая клеточным и более высокими уровнями организации живых систем. Более того, именно на базе таких представлений появилась возможность для построения взаимосвязанной картины, позволяющей с единой точки зрения рассмотреть основные особенности структуры, а также физико-химические механизмы, обеспечивающие возможность функционирования и устойчивость живых систем, включая и возможность их эволюции, т. е. те главные характеристики, которые отличают жизнь от неживого вещества.

Низкая устойчивость уже исходных мономеров, которые входят в состав основных биологических структур, сделала невозможным для живых систем путь обеспечения своего существования за счет повышения прочности и химической стойкости своих структур и предопределила выбор другого, единственно возможного в подобных условиях варианта для их длительного существования — воспроизводства новых структур взамен разрушенных. В свою очередь, обеспечение воспроизводства, связанного с избирательностью реакций и с возможностью их регуляции, потребовало высокой чувствительности для осуществляющих такие процессы структур к управляющим воздействиям. И здесь решающим фактором оказалось взаимодействие разнообразных биологических структур, в первую очередь, белков с водным окружением.

В результате появилась возможность для решения целого ряда задач, необходимых для эффективной работы биологических систем. Многосторонний характер воздействия воды, определяемый как разрыхляющим, так и стабилизирующим ее воздействием на структуру биополимеров, явился решающим фактором в достижении равновесия сил в пределах белковых макромолекул и в обеспечении, таким образом, их высокой чувствительности к управляющим воздействиям. Равновесие сил в пределах макромолекул белков в водной среде обусловило и появление динамической структуры белков, играющей весьма важную роль в их

функционировании и в возможности управления биологическими процессами. Наличие равновесия сил, наряду с возможностью перестройки структуры в большом объеме, включающем не только макромолекулу белков, но и их водное окружение, позволило получать большие эффекты при использовании слабых взаимодействий. Появились условия также для снижения вероятности обратных реакций за счет перестройки окружения по мере прохождения различных стадий процесса, что существенно повысило их эффективность.

Вместе с тем, та же лабильность структуры белков, необходимая для их нормального функционирования, не имела бы смысла без наличия в структуре макромолекул более жестко связанных участков, определяющих как возможность их самоорганизации, так и для существования в определенных временных пределах также лабильных участков макромолекул. Однако в условиях постоянно действующих помех и жесткость структуры имеет далекие от достижимых пределов ограничения. В результате для организмов из-за принципиальной невозможности исключения ошибок и все более дорогой, с каждым следующим шагом, ценой снижения их вероятности, более эффективным оказывается коррекция ошибок, пусть даже путем уничтожения измененных и непригодных для нормального функционирования структур. И здесь важную роль играет динамическая структура макромолекул биополимеров.

Регуляторная роль воды активно проявляется и на мембранном уровне организации. Здесь помимо ее роли в формировании структуры мембран вода создает условия также для регуляции процессов в пределах мембран, в том числе для обеспечения эффективности процессов фотосинтеза, что наблюдалось на нескольких этапах переноса электрона в фотосинтетической цепи. Вместе с тем, динамика мембран и ее компонентов в присутствии воды служит предпосылкой и для сложного характера поведения ряда биологически активных веществ в мембранах, с которым может быть связана полифункциональность их воздействия.

Динамическая структура белков в воде обуславливает также ряд явлений на клеточном уровне. С изменением ее динамики связаны большие энтропийные эффекты, определяемые процессами сорбции-десорбции белков на мембранах и других клеточных структурах. В свою очередь, это определило возможность малых изменений свободной энергии в процессах перехода между связанным и свободным состояниями белков. В результате возникли условия как для включения в активные процессы белков при переходе в воду, так и для значительного упрочнения структуры нефункционирующих белков и их сохранения при иммобилизации. Те же эффекты обусловили и важную роль, при малой разности свободных энергий, относительно больших порогов для перехода между указанными состояниями, что позволило дифференцировать различные

факторы по длительности их воздействия. На этой основе удалось объяснить специфичность общерегуляторного воздействия ионов кальция по сравнению с ионами магния. Учет такого рода факторов создал также предпосылки для использования в управлении клеточными процессами воздействий, лишь немногим превышающих величину тепловой энергии kT , а в отдельных случаях и существенно ниже kT .

Рассмотрение указанных факторов выявило также важную роль объемной фазы воды и ее состояния в клетках для управления метаболическими процессами. Наличие условий для перехода белков в эту фазу и обратно определяет предпосылки для чувствительности подобных процессов к состоянию воды, тогда как их нарушение может привести к гибели организмов даже при потере относительно небольшой части воды.

На этой основе и с учетом нелинейных эффектов периодического движения ионов получили объяснение основные аномалии биологических эффектов ЭМП низких частот, в том числе чувствительность клеточных процессов к воздействию магнитных бурь и ослабление эффектов при росте амплитуды ЭМП. Отмечена также возможность — в зависимости от состояния организма и длительности воздействия — получения эффектов как стимуляции, так и торможения метаболизма, включая возможность влияния подобных явлений на социальные процессы.

Но высокая чувствительность определяет и относительную медленность реакций, характерную прежде всего для физиологических процессов. В то же время в биологических системах существует своеобразная иерархия времен для различных реакций и для роли динамики структур в таких процессах. И чем времена короче, тем менее чувствительны они к управляющим воздействиям из-за наличия различного рода помех, частично усредняемых при росте временного интервала, тогда как в пикосекундном диапазоне, например в реакциях фотосинтеза, приходится расплачиваться частью энергии светового кванта для снижения вероятности обратной реакции.

Весьма существенно, что неустойчивость отдельных биологических структур (включая и неустойчивость носителя наследственной информации — ДНК) сделала возможной их существование в непостоянных условиях среды и их эволюцию, в том числе возможность ускорения процесса эволюции при заметном изменении условий среды. Устойчивость ДНК, как и других биологических систем, имеет не статический, а динамический характер. И здесь, как и всюду, наличие, казалось бы, несовместимого с устойчивостью условия — относительной изменчивости ДНК в таких процессах — обеспечивает возможность для длительного существования биологических структур в меняющихся условиях среды.

Регуляторная роль воды и ее ведущая роль в определении равновесия сил в пределах различных биологических структур отчетливо проявляются и при исследовании эффектов замораживания и высушивания. Здесь помимо прямого воздействия льдообразования и высушивания приходится учитывать возможность нарушения равновесия сил на различных уровнях организации биологических систем, особенно при промежуточных значениях температуры и влажности. Эти же факторы определяют зависимость данных эффектов от вида организмов и от условий их функционирования или фазы роста. Вместе с тем, изменение вклада со стороны воды определяет появление ряда эффектов, способствующих защите клеточных структур от внешних воздействий, что имеет важное практическое значение.

В целом все рассмотренные данные дают основание утверждать, что регуляторная роль воды в биологических структурах является именно тем фактором, который определяет уникальное значение воды в биологических системах и невозможность ее замены на какой-либо другой растворитель.

Литература

- [1] Абатуров Л. В. *Водородный обмен в белках* // Итоги науки и техники. Молекул. биология. Т. I. ч. 2. М.: ВИНТИ (1976). С. 7–126.
- [2] Абатуров Л. В., Варшавский Я. М. *О равновесной динамике пространственной структуры глобулярных белков* // Молекул. биология Т. 12, (1978). С. 36–46.
- [3] Абецедарская Л. А., Мальцев Н. А., Мифтахутдинова Ф. Г., Федотов В. Д. *Протонная релаксация в растворах и гелях некоторых белков* // Молекул. биология. Т. I (1967). С. 451–462.
- [4] Абецедарская Л. А., Мифтахутдинова Ф. Г., Федотов В. Д. *О состоянии воды в живых тканях (результаты исследований методом ЯМР — спиновое эхо)* // Биофизика. Т. 13. (1968). С. 630–636.
- [5] Абрагам А. *Ядерный магнетизм*. М.: ИИЛ, 1963, 552 с.
- [6] Айала Ф. *Введение в популяционную и эволюционную генетику*. М.: Мир, 1984, 230 с.
- [7] Аксенов С. И. *О состоянии воды в биологических объектах с малой влажностью* // Анабиоз и преданабиоз микроорганизмов. Рига: Зинатне, 1973. С. 41–50.
- [8] Аксенов С. И. *Об оценках состояния воды в биологических объектах по данным различных физических методов* // Биофизика. Т. 22. (1977). С. 923–924.
- [9] Аксенов С. И. *Исследование конформационной подвижности белков в водных средах методом ядерного магнитного резонанса* // Равновесная динамика нативной структуры белка. Пушино. 1977, стр. 42–59.
- [10] Аксенов С. И. *Состояние воды в биологических объектах* // Связанная вода в дисперсных системах. Вып. 5. М.: Изд-во МГУ. (1980). С. 48–76.
- [11] Аксенов С. И. *О предельной продолжительности анабиоза у микроорганизмов* // Микробиология. Т. 51. (1982). С. 877–880.
- [12] Аксенов С. И. *Исследование динамической структуры глобулярных белков импульсными методами ЯМР* // Молекул. биология. Т. 17. (1983). С. 475–483, 235.
- [13] Аксенов С. И. *Роль воды в процессах функционирования биологических структур и в их регулировании* // Биофизика. Т. 30. (1985). С. 220–223.

- [14] Аксенов С. И. *Особенности воздействия воды на состояние биологических структур* // Торможение жизнедеятельности клеток. Рига: Зинатне. (1987). С. 55–71.
- [15] Аксенов С. И. *Метод ЯМР релаксации* // Новые физические методы в биологических исследованиях. М.: Наука. С. 147–163.
- [16] Аксенов С. И. *Вода и ее роль в регуляции биологических процессов*. М.: Наука, 1990, 118 с.
- [17] Аксенов С. И. *Динамический характер устойчивости биологических систем* // Журн. физической химии. Т. 69. (1995). С. 1406–1409.
- [18] Аксенов С. И. *О механизмах приспособления семян к высушиванию* // Тезисы докл. IV съезда физиологов растений России. Т. 1. (1999). С. 312.
- [19] Аксенов С. И., Аскоченская Н. А., Головина Е. А. *Изучение состояния воды в семенах разного качественного состава и его изменения при температурных воздействиях* // Физиология растений. Т. 24. (1977). С. 1251–1260.
- [20] Аксенов С. И., Аскоченская Н. А., Головина Е. А. *Исследование начальных этапов набухания семян пшеницы методом спинного эха ЯМР* // Доклады АН СССР. Т. 264. (1982). С. 725–729.
- [21] Аксенов С. И., Бабьева И. П., Голубев В. И. *Исследование процессов увлажнения и высушивания у капсульных и безкапсульных форм *Cryptococcus albidus* var *diffluens* методом спинного эха ЯМР* // Известия АН СССР. сер. биол. N 4. (1972). С. 545–558.
- [22] Аксенов С. И., Боброва М. Н., Бочаров Е. А., Гиппиус А. А., Нокс П. П., Кононенко А. А., Ревокатов О. П., Рубин А. Б., Шмелева Е. А. *Влияние гидратации на структуру, динамику и функцию фотосинтетических мембран пурпурных бактерий* // Биол. мембраны. Т. 14. (1997). С. 5–17.
- [23] Аксенов С. И., Боженко В. К., Калачихина О. Д. *Влияние низкомолекулярных лигандов на релаксацию протонов воды в растворах белков* // Биофизика. Т. 35. (1990). С. 39–42.
- [24] Аксенов С. И., Боженко В. К., Захарова Н. И., Кононенко А. А., Николаев Г. М., Нокс П. П., Рубин А. Б. *Исследование эффектов гидратации фотосинтетических мембран и мембранного белка реакционного центра бактерий *Rhodospirillum rubrum* в связи с их функциональной активностью* // Известия. АН СССР. Сер. биол. № 1. (1985). С. 105–116.
- [25] Аксенов С. И., Боженко В. К., Кононенко А. А., Поттосин И. И., Рубин А. Б., Чаморовский С. А. *Влияние гидратации и изотопного замещения $H_2O - D_2O$ на мембранные белки реакционного центра и цитохрома *C* в хроматофорах бактерий *Ectothiorhodospira shaposhnikovii** // Биофизика. Т. 32. (1987). С. 46–50.
- [26] Аксенов С. И., Булычев А. А., Грунина Т. Ю., Туровецкий В. Б. *Механизмы воздействия низкочастотного магнитного поля на началь-*

- ные стадии прорастания семян пшеницы // Биофизика. Т. 41. (1996). С. 931–937.
- [27] Аксенов С. И., Булычев А. А., Грунина Т. Ю., Туровецкий В. Б. *Влияние низкочастотного магнитного поля на активность эстераз и изменение pH у зародыша в ходе набухания семян пшеницы* // Биофизика. Т. 45. (2000). С. 737–745.
- [28] Аксенов С. И., Булычев А. А., Грунина Т. Ю., Горячев С. Н., Туровецкий В. Б. *Эффекты и возможные механизмы воздействия ЭМП сверхнизких частот на семена пшеницы на различных стадиях их набухания и прорастания* // Исследовано в России (электронный журнал). Т. 13. (2000). С. 179–198.
- [29] Аксенов С. И., Бурт А. Ю., Филатов А. В. *Исследование локализации и молекулярной подвижности некоторых физиологически активных веществ в составе искусственных фосфолипидных мембран методом ядерного магнитного резонанса* // Научн. доклады высшей школы, Биол. науки, № 3. (1982). С. 35–38.
- [30] Аксенов С. И., Веселова Т. В., Веселовский В. А., Грунина Т. Ю. *Способ оценки засухоустойчивости сортов зерновых культур*, (1989). // А. С. SU 1630705 A1 (51)5 A01H1/04 по заявке 4667778 с приоритетом от 29 марта 1989 г.
- [31] Аксенов С. И., Гаврилова И. И., Гангард М. Г., Ревокатов О. П. *Исследование взаимодействия диметилсульфоксида с макромолекулами белков методом спинного эха ЯМР* // Криобиология № 4. (1985). С. 31–33.
- [32] Аксенов С. И., Головина Е. А. *Особенности поступления и распределения воды в семенах пшеницы при их набухании*. // Физиология растений Т. 33, (1986). С. 150–158.
- [33] Аксенов С. И., Головина Е. А., Грунина Т. Ю. *Методы ЯМР- и ЭПР-томографии в исследовании распределения и состояния воды в семенах злаков* // Физиология семян. Формирование, прорастание, прикладные аспекты. Душанбе, (1990). С. 251–262.
- [34] Аксенов С. И., Горячев С. Н., Фатеева М. В., Никитина Т. Н. *Исследование различных штаммов дрожжей рода Saccharomycodes с разной устойчивостью к лиофилизации методом спинного эха ЯМР* // Известия АН СССР (сер. биол.) №5. (1973). С. 729–736.
- [35] Аксенов С. И., Горячев С. Н., Николаев Г. М., Сосунова Л. Н. *Изучение реакции на высушивание низших растений в связи с их условиями обитания* // Водный режим растений в связи с разными экологическими условиями. Казань: Изд-во Казан. ун-та. (1978). С. 153–160.
- [36] Аксенов С. И., Горячев С. Н., Шерман Ф. Б., Бабьева И. П., Решетова И. С. *Об изолированной воде в высушенных микроорганизмах* // Микробиология. Т. 47. (1978). С. 549–553.

- [37] Аксенов С. И., Горячев С. Н., Николаев Г. М. *Изолированная подвижная вода как показатель устойчивости организмов к высушиванию* // Торможение жизнедеятельности клеток. Рига: Зинатне. (1987). С. 71–84.
- [38] Аксенов С. И., Горячев С. Н., Денисов В. П., Кононенко А. А., Нокс П. П., Ортэга Л. А., Ревокатов О. П., Рубин А. Б. *Исследование связи между динамикой и функцией фотосинтетических мембран пурпурных бактерий при разной влажности с помощью ^{13}C и ^{31}P -ЯМР спектроскопии* // Биол. мембраны. Т. 8. (1991). С. 491–503.
- [39] Аксенов С. И., Грунина Т. Ю., Смирнов А. И., Якимченко О. Е. *Зондирование состояния воды в семенах пшеницы на начальных этапах их созревания методом ЭПР-томографии* // Биофизика. Т. 36. (1991). С. 318–321.
- [40] Аксенов С. И., Грунина Т. Ю., Горячев С. Н. *Особенности влияния низкочастотного магнитного поля на набухание семян пшеницы на различных стадиях* // Биофизика. Т. 46. (2001). С. 1117–1123.
- [41] Аксенов С. И., Грунина Т. Ю., Горячев С. Н. *О механизмах стимуляции и торможения при прорастании семян пшеницы в ЭМП сверхнизкой частоты* // Биофизика (в печати). (2003).
- [42] Аксенов С. И., Никитин В. А., Шкидченко Ф. Н., Кудрявцев Ф. Ф. *Исследование лиофилизированной биомассы дрожжей *Candida utilis*, взятых на разных стадиях роста, методом спинного эха ЯМР* // Микробиология. Т. 44, (1975). С. 546–551.
- [43] Аксенов С. И., Николаев Г. М. *Исследование состояния воды в биологических объектах с малой влажностью методом спинного эха* // Связанная вода в дисперсных системах. М., изд. МГУ, вып. 2. (1972). С. 154–167.
- [44] Аксенов С. И., Николаев Г. М., Клещева Н. А., Гембицкий П. А. *Исследование влияния гидратации на подвижность и конформацию линейного полиэтиленimina методом спинного эха ЯМР* // Биофизика. Т. 21. (1976). С. 44–49.
- [45] Аксенов С. И., Николаев Г. М., Горячев С. Н. *Изолированная подвижная вода как показатель устойчивости организмов к высушиванию* // Торможение жизнедеятельности клеток. Рига: Зинатне. (1987). С. 74–84.
- [46] Аксенов С. И., Нокс П. П., Рубин А. Б. *Динамика фотосинтетических мембран и ее связь с эффективностью переноса электрона на различных участках цепи фотосинтеза* // Биофизика. Т. 44. (1999). С. 442–447.
- [47] Аксенов С. И., Филатов А. В. *Исследование конформационной подвижности глобулярных белков импульсными методами ЯМР* // Молекул. биология. Т. 12. (1978). С. 522–532.

- [48] Аксенов С. И., Филатов А. В. *Исследование характеристик внутреннего движения в глобулярных белках по температурной зависимости времени спин-решеточной релаксации* // Биофизика. Т. 24. (1979). С. 324–325.
- [49] Аксенов С. И., Филатов А. В. *Сравнительное исследование характеристик спада спинового эха ЯМР протонов различных глобулярных белков в воде* // Биофизика. Т. 24. (1979а). С. 602–605.
- [50] Аксенов С. И., Филатов А. В., Гангардт М. Г., Ревокатов О. П. *Исследование конформационной подвижности глобулярных белков по протонной релаксации во вращающейся системе координат* // Биофизика. Т. 23. (1978). С. 224–227.
- [51] Аксенов С. И., Харчук О. А. *Исследование конформационной подвижности макромолекул сывороточного альбумина в водных растворах методом спинового эха ЯМР* // Молекул. биология. Т. 8. (1974). С. 618–629.
- [52] Аксенов С. И., Харчук О. А. *О состоянии воды в растворах белков и вирусов* // Связанная вода в дисперсных системах. Вып. 4. М.: Изд-во МГУ. (1977). С. 118–137.
- [53] Аксенов С. И., Харчук О. А. *О характеристиках ЯМР для протонов воды и состояния воды в растениях* // Водный режим растений в связи с разными экологическими условиями. Казань: Изд-во Казан. ун-та. (1978). С. 340–346.
- [54] Аксенов С. И., Харчук О. А., Витвицкий В. Н. *Исследование динамических характеристик макромолекул сывороточного альбумина в зависимости от pH и ионной силы методом спинового эха ЯМР* // Молекул. биология. Т. 10. (1976). С. 1018–1026.
- [55] Аксенов С. И., Швалева А. Л. *Состояние мембран при разной влажности и начальных этапах гидратации семян и осевых органов *Triticum aestivum** // Известия РАН (сер. биол.). № 4. (2000). С. 452–460.
- [56] Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. *Молекулярная биология клетки* т. 4, М.: Мир, 1987.
- [57] Александров В. Я. *Клетки, макромолекулы и температура*. Л.: Наука, 1975, 329 с.
- [58] Александров В. Я. *Реактивность клеток и белки*. Л.: Наука, 1985, 318 с.
- [59] Алексеев А. М. *Водный режим растений и влияние на него засухи*. Казань: Татгосиздат, 1948, 356 с.
- [60] Анисимов А. В., Мифтахутдинова Ф. Г., Аксенов С. И. *Исследование трансляционной подвижности воды, изолированной в клетках лиофильно высушенных дрожжей *Cryptococcus albidus* var *diffluens* импульсным методом ЯМР* // Биофизика. Т. 23. (1978). С. 479–484.
- [61] Анисимов А. В., Раткович С. *Транспорт воды в растительных тканях. Исследование импульсным методом ЯМР*. М.: Наука, 1991, 122 с.

- [62] Антонов В. К. *Химия протеолиза*. М.: Наука, 1983, 367 с.
- [63] Антонченко В. Я., Давыдов А. С., Ильин В. В. *Основы физики воды*. Киев: Наукова думка, 1991, 672 с.
- [64] Бекер М. Е. *Биомембраны микроорганизмов при обезвоживании, регидратации и реактивации* // Биомембраны. Структура, функция и методы исследования. Рига: Зинатне. (1977). С. 216–235.
- [65] Бекер М. Е., Дамберг Б. Э., Рапопорт А. И. *Анабиоз микроорганизмов*. Рига: Зинатне, 1981, 252 с.
- [66] Белоус А. М., Бондаренко В. А. *Структурные изменения биологических мембран при охлаждении*. Киев: Наук. думка. 1982, 254 с.
- [67] Берг А. И., Нокс П. П., Кононенко А. А., Фролов Е. Н., Хрымова И. Н., Рубин А. Б., Лихтенштейн Г. И., Гольданский В. И., Парак Ф., Мессбауер Р. *Конформационное регулирование функциональной активности в фотосинтетических мембранах пурпурных бактерий* // Молекул. биология. Т. 13. (1979). С. 81–89.
- [68] Белая М. Л., Левадный В. Г. *Молекулярная структура воды*. М., Знание, 1987, 64 с.
- [69] Бергельсон Л. Д. *Биологические мембраны*. М.: Наука, 1975, 184 с.
- [70] Березин И. В., (ред.) *Химическая энзимология*. М.: Химия, 1983, 278 с.
- [71] Бинги В. Н. *Магнитобиология. Эксперименты и модели*. М.: ИОФАН, 2002, 592 с.
- [72] Бинги В. Н., Савин А. В. *Физические проблемы действия слабых магнитных полей на биологические системы* // Успехи физических наук. Т. 173. (2003). С. 265–300.
- [73] Блюменфельд Л. А. *Проблемы биологической физики*. М.: Наука, 1977, 335 с.
- [74] Блюменфельд Л. А., Давыдов Р. М., Куприн С. П., Степанов В. С. *Химические характеристики конформационно-неравновесных состояний металлосодержащих белков* // Биофизика. Т. 22. (1977). С. 977–984.
- [75] Болдырев А. А. *Биологические мембраны и транспорт ионов*. М.: Изд-во МГУ, 1985, 208 с.
- [76] Борисов А. Ю. *Принцип мгновенного действия фотосинтеза* // Молекул. биология. Т. 10. (1976). С. 460–465.
- [77] Брандтс Дж. Ф. *Конформационные переходы белков в воде и смешанных водных растворителях* // Структура и стабильность биологических макромолекул. М.: Мир, (1973). С. 174–254.
- [78] Бургасов П. Н., Румянцев С. Н. *Антимикробный конституциональный иммунитет*. М.: Медицина, 1983, 256 с.

- [79] Бурт А. Ю. *Исследование механизмов взаимодействия нейротропных препаратов с модельными фосфолипидными мембранами*. Автореферат дисс. канд. биол. наук. М.: МГУ, (1986). 22 с.
- [80] Бурштейн Э. А. *Собственная люминесценция белков. Природа и применение* // Итоги науки и техники. Биофизика. Т. 7. М.: ВИНТИ, (1977). С. 7–187.
- [81] Бутенко Р. Г. *Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений*. М.: Наука, 1975.
- [82] Бучаченко А. Л., Сагдеев Р. З., Салихов К. М. *Магнитные и спиновые эффекты в химических реакциях*. Новосибирск, Наука, 1978, 294 с.
- [83] Ваганов А. *Весна. Война. НЛО*. // Независимая газета, приложение НГ-наука, (2003).
- [84] Веселовский В. А., Веселова Т. В. *Рекомбинационная люминесценция фотосинтезирующих организмов и ее практическое использование* // Биохемилюминесценция М.: Наука, (1983). С. 241–258.
- [85] Веселовский В. А., Веселова Т. В. *Люминесценция растений*. М., Наука, 1990, 202 с.
- [86] Веселовский В. А., Веселова Т. В., Бочваров П. З., Маренков В. С., Рубин А. Б. *Способ определения жизнеспособности семян растений* // А.с. СССР 1131483 с приоритетом от 31 декабря 1982 г., (1984).
- [87] Вигасин А. А. *Структура и свойства ассоциатов воды* // Ж. структурной химии. Т. 24. (1983). С. 116–141.
- [88] Виленчик М. М. *Тепловая неустойчивость гена в физиологических условиях*. (1976).
- [89] *Биофизические, молекулярно-генетические и геронтологические аспекты* // Успехи соврем. биологии. Т. 82. С. 371–381.
- [90] Виленчик М. М. *Нестабильность ДНК и отдаленные последствия воздействия излучений*. М., Энергоатомиздат, 1987, 202 с.
- [91] Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. *Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран*. М.: Наука, 1980, 320 с.
- [92] Владимирский Б. М., Сидякин В. Г., Темурянц Н. А., Макеев В. В., Самохвалов В. П. *Космос и биологические ритмы*. Симферополь. Гелиоритм, 1996, 206 с.
- [93] Волькенштейн М. В. *Физика ферментов*. М.: Наука, 1967, 200 с.
- [94] Волькенштейн М. В. *Молекулярная биофизика*. М.: Наука, 1975, 616 с.
- [95] Волькенштейн М. В. *Биофизика*. М.: Наука, 1988, 592 с.
- [96] Гейльбрун Л. *Динамика живой протоплазмы*. М.: Изд-во иностр. лит., 1957, 346 с.

- [97] Геодакян В. А. *Теория дифференциации полов в проблемах человека* // Человек в системе наук. М.: Наука, (1989). С. 171–189.
- [98] Герасимов В. В. *Действие физико-химических факторов на тепловые конформационные превращения биологических структур*: Дисс. док. биол. наук. М.: МГУ, (1986). 239 с.
- [99] Гневыхов М. Н., Оль А. И. *Влияние солнечной активности на биосферу* // Проблемы космической биологии. Т. 15. М.: Наука. (1982).
- [100] Голдовский А. М. *Основы учения о состояниях организма*. М.: Наука, 1977, 371 с.
- [101] Головина Е. А., Смирнов А. И., Якимченко О. Е., Аксенов С. И. *ЭПР-томография путей поступления водного раствора нитроксильного радикала в зерновку пшеницы* // Физиология растений Т. 38. (1991). С. 119–125.
- [102] Гольдманский В. И., Крупянский Ю. Ф. *Динамика биополимеров и стеклообразная модель белков и ДНК* // Успехи физических наук. Т. 143. (1984). С. 329–331.
- [103] Горизонтов П. Д. (ред.) *Гомеостаз*. М.: Медицина, 1981, 376 с.
- [104] Грант В. *Эволюция организмов*. М.: Мир, (1980). 407 с.
- [105] Грико Ю. В., Привалов П. Л. *Холодовая денатурация миоглобина в щелочных растворах* // Докл. АН СССР. Т. 291. (1986). С. 709–711.
- [106] Гродзинский Д. М. *Надежность растительных систем*. Киев: Наук. думка, (1983). 368 с.
- [107] Грунина Т. Ю. *Исследования состояния воды в семенах озимой пшеницы в процессе их созревания*. Автореферат дисс. канд. биол. наук, М.: МГУ, (1989). 22 с.
- [108] Гулевский А. К., Бондаренко В. А., Белоус А. М. *Барьерные свойства биомембран при низких температурах*. Киев: Наук. думка, 1988, 205 с.
- [109] Гусев Н. А. *Состояние воды в растении*. М.: Наука, 1974, 92 с.
- [110] Гюнтер Х. *Введение в курс спектроскопии ЯМР*. М.: Мир, 1984, 478 с.
- [111] Девятков Н. Д. *Взаимодействие миллиметрового излучения с биологически активными соединениями и полярными жидкостями* // Радиотехника и электроника № 9. (1978). С. 1882–1890.
- [112] Девятков Н. Д., Голант М. У., Бецкий О. В. *Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности*. М.: Радио и связь, 1991, 168 с.
- [113] Добрецов Г. Е. *Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов*. М.: Наука, (1986).
- [114] Дроздова Т. В. *Геохимия аминокислот*. М.: Наука, 1977, 199 с.
- [115] Дуда В. И. *Анабиоз бактериальных спор* // Торможение жизнедеятельности клеток. Рига: Зинатне, (1987). С. 155–159.

- [116] Еремин А. Н., Метелица Д. И. *Регуляция каталитической активности пероксидазы в смешанных мицеллах ПАВ* // Биохимия. Т. 50. (1985). С. 102–108.
- [117] Жестянников В. Д. *Репарация ДНК и ее биологическое значение*. Л.: Наука, 1979, 285 с.
- [118] Замараев К. И. Молин Ю. Н., Салихов К. М. *Спиновый обмен. Теория и физико-химические приложения*. Новосибирск, Наука. (1977).
- [119] Замятин А. А. *Дилатометрия растворов белков*. М.: Наука, 1973, 102 с.
- [120] Заславский Б. Ю., Масимов Э. А., Михеева Л. М., Рогожин С. В., Хасаев Д. П. *Способ оценки относительной гидрофобности водных растворов полимеров* // Докл. АН СССР. Т. 261. (1981). С. 669–671.
- [121] Зелепухин В. Д., Зелепухин И. Д. *Ключ к «живой» воде*, Алма-Ата: Кайнар, 1987, 176 с.
- [122] Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. *Динамическая структура липидного бислоя*. М.: Наука, 1981, 293 с.
- [123] Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. *Липидный бислой биологических мембран*. М.: Наука, 1982, 224 с.
- [124] Имшенецкий А. А., Комолова Г. С., Лысенко С. В., Гамуля Г. Д. О влиянии глубокого вакуума на активность некоторых ферментов // Докл. АН СССР. Т. 191. (1970). С. 1088–1090.
- [125] Кагава Я. *Биомембраны*. М.: Высшая школа, 1985, 303 с.
- [126] Кашпур В. А., Малеев В. Я., Щеголева Т. Ю. *Исследование гидратации глобулярных белков методами диэлектрической спектроскопии в миллиметровом диапазоне* // Молекул. биология. Т. 10. (1976). С. 568–575.
- [127] Квилидзе В. И. *Изучение адсорбированной воды методом ядерного магнитного резонанса* // Связанная вода в дисперсных системах. М.: Изд-во МГУ. Вып. I. (1970). С. 41–55.
- [128] Кениг С. *Динамика взаимодействий в системе вода-белок. Результаты, полученные из измерений дисперсии ядерной магнитной релаксации* // Вода в полимерах. М.: Мир, (1984). С. 159–182.
- [129] Кимура М. *Молекулярная эволюция: Теория нейтральности*. М.: Мир, 1985, 398 с.
- [130] Китайгородский А. И. *Молекулярные кристаллы*. М.: Наука, 1971, 424 с.
- [131] Клейтон Р. *Фотосинтез. Физические механизмы и химические модели*. М.: Мир, 1984, 350 с.
- [132] Клесов А. А., Березин И. В. *Ферментативный катализ*. М.: Изд-во МГУ, 1980, 264 с.
- [133] Клотц И. *Вода* // Горизонты биохимии. М.: Мир, (1964). С. 399–419.

- [134] Клячко Н. Л., Левашов А. В., Мартинек К. *Катализ ферментами, включенными в обращенные мицеллы ПАВ в органических растворителях. Пероксидаза в системе ОТ-вода-октан* // Молекул. биология Т. 18. (1984). С. 1019–1031.
- [135] Колдин Е. *Быстрые реакции в растворах*. М.: Мир, 1966, 309 с.
- [136] Конев С. В., Волоотовский И. Д. *Структурные перестройки биологических мембран* // Биомембраны: структура, функции, методы исследования. Рига: Зинатне, (1977). С. 42–76.
- [137] Корогодин В. И. *Радиотаксоны и стабильность генома* // Радиобиология. Т. 22. (1982). С. 147–154.
- [138] Костюк П. Г. *Кальций и клеточная возбудимость*. М.: Наука, 1986, 255 с.
- [139] Котык А., Яначек К. *Мембранный транспорт*. М.: Мир, 1980, 341 с.
- [140] Кошланд Д. *Значение гибкости в ферментативной активности* // Ферменты и синтез биополимеров. М.: Мир, (1967). С. 249–267.
- [141] Коэн Ф. *Регуляция ферментативной активности*. М.: Мир, 1986, 144 с.
- [142] Крупянский Ю. Ф., Шайтан К. В., Гольданский В. И., Куринов И. В., Рубин А. Б., Суздалев И. П. *Исследование динамики белков методами мессбауэровской спектроскопии* // Биофизика. Т. 32. (1987). С. 761–774.
- [143] Ксенжек О. С., Коганов М. М., Гевод О. С. *Исследование взаимодействия цитохрома с с бислойными мембранами* // Биофизика. Т. 22. (1977). С. 616–620.
- [144] Кузнецова И. М., Туроверов К. К. *Поляризация собственной люминесценции белков. III. Внутримолекулярная подвижность триптофановых остатков* // Молекул. биология. Т. 17. (1983). С. 741–753.
- [145] Кузнецова И. М., Туроверов К. К. *Что определяет характеристики собственной флуоресценции белков. Анализ свойств микроокружения и особенностей локализации их триптофановых остатков* // Цитология Т. 40. (1998). С. 747–762.
- [146] Кузьмина Р. И., Медведева С. Е., Терешкова Г. М. *Сравнительное изучение влияния низких температур и сушки на *Alcaligenes eutrophae* *Chlorella vulgaris** // Науч. докл. высш. школы. Биол. науки. № 8, (1987), стр. 63–69.
- [147] Курганов Б. И. *Аллостерические ферменты*. М.: Наука, (1978). 248 с.
- [148] Курганов Б. И. *Физико-химические механизмы регуляции активности ферментов* // Физическая химия. Современные проблемы. М.: Химия. Т. 5. (1985). Стр. 180–219.
- [149] Курзаев А. Б., Квилидивдзе В. И., Киселев В. Ф. *Специфика фазового перехода воды на поверхности биологических и неорганических дисперсных тел при низких температурах* // Связанная вода в дисперсных системах. М.; Изд-во МГУ. Вып. 4. (1977). С. 156–166.

- [150] Кушнер В. П. *Конформационная изменчивость и денатурация биополимеров*. Л.: Наука, 1977, 273 с.
- [151] Кяйвяряйнен А. И. *Динамическое поведение белков в водной среде и их функции*. Л.: Наука, 1980, 271 с.
- [152] Ламри Р., Билтонен Р. *Термодинамические и кинетические аспекты коформаций белков в связи с физиологическими функциями* // Структура и стабильность биологических макромолекул. М.: Мир, (1973). С. 7–173.
- [153] Лившиц В. А., Кузнецов В. А. *Изучение сверхмедленных вращений спин-меченых глобулярных белков путем использования эффектов сверхвысокочастотного насыщения в спектрах ЭПР* // Молекул. биология. Т. 14. (1980). С. 182–189.
- [154] Литвинов И. А., Артамонова С. Д., Николаев Г. М., Аксенов С. И., Кеппен В. А. *Об особенностях гидратации кристаллического линейного полиэтиленimina* // Высокомолекул. соединения. Краткие сообщения. Т. 22. (1980). С. 705–707.
- [155] Лифшиц И. М. *Некоторые вопросы статистической теории биополимеров* // Журн. эксперим. теорет. физики. Т. 55. (1968). С. 2408–2420.
- [156] Лихтенштейн Г. И. *Закономерности в энтропийных и энергетических свойствах ферментативных процессов* // Биофизика. Т. 19. (1966). С. 562–575.
- [157] Лихтенштейн Г. И. *Метод спиновой метки в молекулярной биологии*. М.: Наука, 1974, 256 с.
- [158] Лихтенштейн Г. И., Котельников А. И., Куликов А. В. *О строении и механизмах функционирования реакционных центров фотосинтезирующих бактерий* // Докл. АН СССР. Т. 257, (1981). С. 733–736.
- [159] Лобышев В. И., Калининченко Л. П. *Изотопные эффекты D_2O в биологических системах*. М.: Наука. (1978). 215 с.
- [160] Логинов В. А. *Изменение заряда эритроцитарной мембраны при обработке импульсным магнитным полем* // Биофизика. Т. 36. (1991). С. 614–620.
- [161] Лозина-Лозинский Л. К. *Очерки по криобиологии*. Л.: Наука. (1972). 288 с.
- [162] Максимов Н. А. *Физиологические основы засухоустойчивости растений*. М.: Изд-во АН СССР. (1926). 320 с.
- [163] Маленков Г. Г., Дьяконова Л. П. *Машинное моделирование гидратной воды* // Молекулярная физика и биофизика водных систем. Л.: Изд-во ЛГУ, (1979). С. 95–110.
- [164] Маленков Г. Г. *Структура воды* // Физическая химия. Современные проблемы. М., Химия, (1984). С. 41–76.

- [165] Манк В. В., Лебовка Н. И. *ЯМР-спектроскопия воды и водных систем*. Киев: Знание, 1980, 22 с.
- [166] Мартинек К., Левашов А. В., Клячко Н. Л. и др. *Мицеллярная энзимология* // Биол. мембраны. Т. 2. (1985). С. 669–695.
- [167] Микельсаар Х. Н., Саул К., Саул М. *Аминокислотный состав белков* // Успехи соврем. биологии. Т. 84. (1977). С. 367–389.
- [168] Мирошниченко Л. И. *Солнечная активность и Земля*. М., Наука. 1981.
- [169] Мифтахутдинова Ф. Г., Анисимов А. В., Великанов Г. А. *Исследование самодиффузии воды в биологических объектах методом спинного эха с применением импульсного градиента магнитного поля* // Докл. АН СССР. Т. 224. (1975). С. 487–490.
- [170] Мревлишвили Г. М. *Низкотемпературная калориметрия биологических макромолекул*. Тбилиси: Мецниереба. 1984, 189 с.
- [171] Мревлишвили Г. М., Привалов П. Л. *Исследование гидратации макромолекул калориметрическим методом* // Состояние и роль воды в биологических объектах. М.: Наука, (1967). С. 87–92.
- [172] Мухачев В. И. *Живая вода*. М.: Наука, 1975, 142 с.
- [173] Наберухин Ю. И., Рогов В. А. *Строение водных растворов незлектролитов. Сравнительный анализ термодинамических свойств водных и неводных двойных систем* // Успехи химии. Т. 11. (1971). С. 369–384.
- [174] Насонов Д. Н., Александров В. Я. *Реакция живого вещества на внешние воздействия*. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1940.
- [175] Недев К. Н. *О распределении атомной плотности в белковых глобулах* // Биофизика. Т. 23, (1978). С. 602–604.
- [176] Недев К. Н., Хургин Ю. И. *Исследование структуры поверхности белковой глобулы* // Молекул. биология. Т. 9. (1975). С. 761–767.
- [177] Николаев Г. М., Маторин Д. Н., Аксенов С. И. *Состояние воды и функционирование первичных реакций фотосинтеза у лишайника *Plascolecanora melanophthalma* из холодных пустынь Восточного Памира* // Научные докл. высшей школы, Биол. науки № 1, (1977). С. 97–102.
- [178] Николс Д. Д. *Биоэнергетика. Введение в хемиосмотическую теорию*. М.: Мир, 1985, 190 с.
- [179] Новиков И. А., Сухоруков Б. И. *Исследование роли воды в тепловой нестабильности ДНК* // Молекул. биология. Т. 11. (1977). С. 521–530.
- [180] Нокс П. П., Лукашев Е. П., Кононенко А. А. и др. *О возможной роли макромолекулярных компонентов в функционировании фотосинтетических реакционных центров пурпурных бактерий* // Молекул. биология. Т. 11. (1977). С. 1090–1099.

- [181] Нокс П. П., Кононенко А. А., Рубин А. Б. *Функциональная активность фотосинтетических реакционных центров из Rhodosp. sphaeroides при фиксированной гидратации препаратов* // Биоорганическая химия. Т. 5. (1979). С. 879–885.
- [182] Огай В. Б., Новоселова Е. Г., Фесенко Е. Е. *Исследование влияния низкоинтенсивного электромагнитного излучения сантиметрового и миллиметрового диапазонов на пролиферативную и цитотоксическую активность лимфоцитов селезенки мышей* // Биофизика. Т. 48, (2003). С. 511–520.
- [183] Петров Р. В. *Иммунология*. М.: Медицина. 1982, 368 с.
- [184] Петроченко С. И., Привалов П. Л. *Изменение гидратации глобулярных белков после тепловой денатурации* // Биофизика. Т. 18. (1973). стр. 555–557.
- [185] Платонов А. Л., Протасевич И. И., Евдокимов Ю. М. и др. *Тепловой эффект, предшествующий компактизации двухцепочечной структуры ДНК в полиэтиленгликольсодержащих водно-солевых растворах* // Молекул. биология. Т. 10. (1976). С. 321–325.
- [186] Плюснина Т. Ю., Ризниченко Г. Ю. *Типы нелинейного поведения системы переноса ионов через мембрану при слабом воздействии электрического поля* // Биофизика. Т. 41. (1996). С. 939–943.
- [187] Плюснина Т. Ю., Ризниченко Г. Ю., Аксенов С. И., Черняков Г. М. *Влияние слабого электрического воздействия на триггерную систему трансмембранного ионного переноса* // Биофизика. Т. 39. (1994). С. 345–360.
- [188] Пожидаев Е. А. *Развитие зародыша*. М.: Медицина, 1965, 66 с.
- [189] Полевой В. В. *Физиология растений*. М.: Высшая школа, 1989, 464 с.
- [190] Попов Е. М. *Эмпирические корреляции между аминокислотной последовательностью и пространственным строением белков* // Молекул. биология. Т. 14. (1980). С. 35–63.
- [191] Поттосин И. И., Чаморовский С. К., Кононенко А. А., Успенская Н. Я. *Влияние дегидратации на перенос электрона от мембраносвязанного цитохрома с к бактериохлорофиллу фотосинтетического реакционного центра в хромофорах пурпурных бактерий* // Молекул. биология. Т. 18. (1984). С. 821–830.
- [192] Пресман А. С. *Электромагнитные поля и живая природа*. М.: Наука, 1968, 288 с.
- [193] Привалов П. Л. *Энергетика структуры белковых молекул* // Биофизика. Т. 30. (1985). С. 722–733.
- [194] Привалов П. Л. *Стабильность белков и гидрофобные взаимодействия* // Биофизика. Т. 32. (1987). С. 742–760.

- [195] Прокофьев А. А., Обручева Н. В., Ковадло Л. С. и др. *Критический уровень оводненности семян для их прорастания* // Физиол. растений Т. 30. (1983). С. 178.
- [196] Птицын О. Б. *Природа сил, определяющих нативные пространственные структуры глобулярных белков* // Успехи соврем. биологии. Т. 63. (1967). С. 3–27.
- [197] Птицын О. Б. *Белок как отредактированный статистический сополимер* // Молекул. биология. Т. 18. (1984). С. 574–590.
- [198] Птицын О. Б., Скворцов А. М. *Теория переходов спираль-клубок в биополимерах. У. Метод определения кооперативности перехода спираль-клубок в полипептидных цепях по изменению размеров макромолекул в области перехода* // Биофизика. Т. 10. (1965). С. 909–917.
- [199] Птицын О. Б., Финкельштейн А. В. *Проблема предсказания структуры белка* // Итоги науки и техники. Молекул. биология. М.: ВИНТИ. Т. 15. (1979). С. 6–41.
- [200] Пушкарь Н. С., Белоус А. М. (ред.) *Актуальные проблемы криобиологии*. Киев: Наук. думка, 1981, 606 с.
- [201] Рапли Дж. *Сравнение структуры белка в кристалле и в растворе* // Структура и стабильность биологических макромолекул. М.: Мир, (1973). С. 255–319.
- [202] Рапли Дж., Янг П., Толлин Т. *Исследование термодинамических и других параметров взаимодействия воды с белками* // Вода в полимерах. М.: Мир, (1984). С. 114–136.
- [203] Рей Л., Симато Д. *Биофизические аспекты действия низких температур на живые клетки и ткани* // Клетка и температура среды. М.-Л.: Наука. С. 59–66.
- [204] Реутов В. П., Сорокина Е. Г., Косицын Н. С., Охотин В. Е. *Проблема оксида азота в биологии и медицине и принцип цикличности*. М., УРСС, 2003, 94 с.
- [205] Ризниченко Г. Ю., Плюснина Т. Ю. *Нелинейная организация субклеточных систем — условие отклика на слабые электромагнитные воздействия* // Биофизика. Т. 41. (1996). С. 428–432.
- [206] Ризниченко Г. Ю., Плюснина Т. Ю., Воробьева Т. Н., Аксенов С. И., Черняков Г. М. *Модель ответа системы мембранного транспорта на переменное электрическое поле* // Биофизика. Т. 38. (1993). С. 667–671.
- [207] Ризниченко Г. Ю., Воробьева Т. Н., Рубин А. Б. *Кинетические и физические параметры переноса электрона в фотосистеме I* // Молекул. биология. Т. 27. (1993). С. 761–769.
- [208] Росляков В. Я., Хургин Ю. И. *Твердофазный гидролиз циннамоил- α -химотрипсина* // Биохимия. Т. 37. (1972). С. 493–497.

- [209] Рубин А. Б. *Биофизика. Кн. I. Теоретическая. биофизика*. М.: Высш. шк. 1987, 319 с.
- [210] Рубин А. Б., Венедиктов П. С., Кренделева Т. Е., Пашенко В. З. *Регуляция первичных стадий фотосинтеза при изменении физиологического состояния растений* // Фотосинтез и продукционный процесс. М.: Наука, (1988). С. 29–40.
- [211] Румянцев С. Н. *Конституциональный иммунитет и его молекулярно-экологические основы*. Л.: 1983, 210 с.
- [212] Рязанов А. Г., Спирин А. С. *Организация ферментов на внутриклеточных структурах, эстафета у поверхности* // Биохимия. Т. 54. (1989). С. 709–715.
- [213] Самойлов О. Я. *Структура водных растворов электролитов и гидратация ионов*. М.: Изд-во АН СССР, 1957, 192 с.
- [214] Сарвазян А. П. *Ультразвуковая велосимметрия биологических соединений* // Молекул. биология. Т. 17. (1983). С. 916–927.
- [215] Сидорова А. И., Кочнев И. Н., Моисеева Л. В. Халоимов А. И. *Исследование состояния тканевой воды методом инфракрасной спектроскопии* // Состояние и роль воды в биологических объектах. М.: Наука, (1967). С. 75–87.
- [216] Скулачев В. П. *Трансформация энергии в биомембранах*. М.: Наука, 1972, 203 с.
- [217] Сливхтер Ч. *Основы теории ядерного магнитного резонанса* М.: Мир. 1967, 324 с.
- [218] Смирнов А. И., Якимченко О. Е., Аксенов С. И., Головина Е. А., Лихтенштейн Г. И., Лебедев Я. С. *ЭПР-томографическое исследование распределения водного раствора зонда при набухании зерна пшеницы* // Физиология растений. Т. 35. (1988). С. 663–668.
- [219] Соколов З. Н., Маторин Д. Н., Аксенов С. И., Булычев А. А., Венедиктов П. С. *Влияние изотопного замещения H_2O на D_2O на стабильность и функциональную активность фотосинтетических мембран зеленых бактерий* // Вестник МГУ. Сер. биолог. № 3. (1982). С. 51–57.
- [220] Спирин А. С. *Молекулярная биология. Структура рибосом и биосинтез белков*. М.: Высшая. школа, 1986, 302 с.
- [221] Старквезер Х. *Вода в найлоне* // Вода в полимерах. М.: Мир, (1984). С. 412–419.
- [222] Струнников В. А. *Генетические основы гетерозиса и комбинационной способности у тутового шелкопряда* // Генетика. Т. 22. (1986). С. 229–243.
- [223] Струнников В. А. *Природа и проблемы гетерозиса* // Природа. № 5. (1987). С. 64–76.

- [224] Струнников В. А., Леженко С. С., Степанова Н. Л. *Клонирование тутового шелкопряда* // Генетика. Т. 19. (1983). С. 82–94.
- [225] Суздалев И. П. *Гамма-резонансная спектроскопия белков и модельных соединений*. М.: Наука, (1988). 262 с.
- [226] Туроверов К. К., Кузнецова И. М. *Собственная УФ-флуоресценция белков как инструмент для изучения их динамики* // Цитология. Т. 40. (1998). С. 735–746.
- [227] Фершт Э. *Структура и механизм действия ферментов*. М.: Мир, 432 с. 89, 1980, 112 с.
- [228] Фридрих П. *Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы*. М.: Мир, 1986, 374 с.
- [229] Харди Р. *Гомеостаз*. М.: Мир, 1986.
- [230] Хвидт А., Нильсен С. *Водородный обмен в белках* // Химия белка. М.: Мир, (1969). С. 136–236.
- [231] Хечинашвили Н. Н., Цетлин В. И. *Калориметрическое исследование тепловой денатурации токсинов* // Молекуляр. биология. Т. 18. (1984). С. 786–791.
- [232] Хиппель П., Шлейх Т. *Влияние нейтральных солей на структуру и конформационную стабильность макромолекул в растворе* // Структура и стабильность биологических макромолекул в растворе. М.: Мир, (1973). С. 320–380.
- [233] Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Мартинек К. *Микрогетерогенная среда для химических (ферментативных) реакций на основе коллоидного раствора воды в органическом растворителе* // Успехи химии. Т. 53. (1984). С. 545–565.
- [234] Хочачка П., Сомеро Дж. *Стратегия биохимической адаптации*. М.: Мир, 1977, 398 с.
- [235] Хочачка П., Сомеро Дж. *Биохимическая адаптация*. М.: Мир, 1988, 568 с.
- [236] Хургин Ю. И. *Гидратация глобулярных белков* // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. Т. 21. (1976). С. 684–690.
- [237] Хургин Ю. И., Росляков В. Я., Азизов Ю. М., Каверзнева Е. Д. *Эстеразная активность химотрипсина в диметилсульфоксиде* // Изв. АН СССР. Сер. хим. Т. 12. (1968). С. 2840–2846.
- [238] Чаморовский С. К., Кононенко А. А., Поттосин И. И., Рубин А. Б. *Влияние изотопного замещения H_2O-D_2O на перенос электрона от цитохрома с к фотосинтетическому реакционному центру* // Биофизика. Т. 33. (1988). С. 609–612.
- [239] Чен Лу Цоу. *Роль гибкости активного центра в ферментативном катализе* // Биохимия Т. 63. (1998). С. 300–307.

- [240] Чернавский Д. С., Хургин Ю. И., Шноль С. Э. *Об упругих деформациях белка-фермента* // Молекул. биология. Т. I, (1967). С. 419–424.
- [241] Чижевский А. Л. *Физические факторы исторического процесса*. Калуга, 1974.
- [242] Чижевский А. Л. *Земное эхо солнечных бурь*. М.: Мысль, 1976, 366 с.
- [243] Шайтан К. В., Рубин А. Б. *Стохастическая динамика и электронно-конформационные взаимодействия в белках* // Биофизика. Т. 30. (1985). С. 517–526.
- [244] Шайтан К. В., Упоров И. В., Рубин А. Б. *Теория миграции лигандов в белках* // Молекул. биология. Т. 19. (1985). С. 742–750.
- [245] Шмидт П. Ю. *Анабиоз*. М.: Изд-во АН СССР, 1955, 436 с.
- [246] Шноль С. Э., Четверикова Е. П., Рыбина В. В. *Синхронные в макрообъеме конформационные колебания в препаратах белков актомиозинового комплекса и в растворах креатинкиназы* // Молекулярная и клеточная биофизика. М.: Наука, (1977). С. 79–93.
- [247] Шульц Г., Ширмер Р. *Принципы структурной организации белков*. М.: Мир, 1982, 354 с.
- [248] Эйзенберг Д., Каудман В. *Структура и свойства воды*. Л.: Гидрометео-издат, 1975, 280 с.
- [249] Юхневич Г. В. *ИК-спектроскопия воды*. М.: Наука, 1973, 208 с.
- [250] Якимченко О. Е., Лебедев Я. С. *ЭПР-томография* // Химическая физика Т. 2. (1983). С. 445.
- [251] Янике Р. *Что можно узнать о стабилизации белка из исследования ультрастабильных глобулярных белков* // Биохимия. Т. 63. (1998). С. 370–380.
- [252] Aksyonov S. I., Babyeva I. P., Golubev V. I. *On the mechanisms of adaptation of microorganisms to conditions of extremely low humidity* // Life Science and Space Res. Vol. XI, Berlin, Academic Verlag. (1973). P. 55–61.
- [253] Aksyonov S. I. *Water as a regulator in biological systems* // Stud. biophysica. Vol. 84. (1981). P. 37–38.
- [254] Aksyonov S. I. *On the state of water in biological systems. Evaluation of methods of its investigations* // Water and Ions in Biological Systems. N. Y.; London: Plenum Press, (1985). P. 687–696.
- [255] Aksyonov S. I. *The role of water in the regulation of biological processes* // Studia biophysica. Vol. 111. (1986). P. 155–158.
- [256] Aksyonov S. I. *Dynamic character of stability of biological systems and effect of water on it* // Studia biophysica Vol. 136. (1990). P. 117–132.
- [257] Aksyonov S. I., Bulychev A. A., Grunina T. Yu., Goryachev S. N., Turovetsky V. B. (2001) Effects of ELF-EMF treatment on wheat at

- different stages of *germination and possible mechanisms of their origin* // Electro- and Magnetobiology Vol. 20. P. 231–253.
- [258] Aksyonov S. I., Filatov A. V. *Pulsed NMR studies of conformational mobility of globular proteins in water solutions* // Studia. biophysica. Vol. 85. (1981). p. 3–4.
- [259] Aksyonov S. I., Golovina E. A. *Specific features of water relations of plant seeds during imbibition and maturation* // Studia. biophysica. Vol. 111. (1986). P. 169–172.
- [260] Aksyonov S. I., Goryachev S. H., Fateeva M. V., Nikitina T. N. *On the origin of slow components of NMR spin-echo decay in dried yeast and their correlation with yeast resistance to drying* // Studia biophysica Vol. 58. (1976). P. 121–129.
- [261] Aksyonov S. I., Goryachev S. H., Denisov V. P., Kononenko A. A., Knox P. P., Ortega L. P., Petrusevich Yu. M., Revokatov O. P., Rubin A. B. *Effects of hydration on dynamic and functional properties of photosynthetic membranes from Rhodospirillum rubrum as revealed by ^{13}C and ^{31}P NMR spectroscopy* // Studia biophysica. Vol. 136. (1990). P. 149–156.
- [262] Aksyonov S. I., Kharchuk O. A. *NMR spin-echo study of serum albumin conformation mobility* // Studia biophysica. Vol. 44. (1973). P. 109–119.
- [263] Aksyonov S. I., Kharchuk O. A., Vitvitsky V. N. *NMR spin-echo study of the dynamic of serum albumin macromolecules in aqueous solutions as a function of pH and ionic strength* // Studia biophysica. Vol. 58. (1976). P. 223–233.
- [264] Aksyonov S. I., Knox P. P., Kononenko A. A., Chamorovsky S. K., Rubin A. B. *Mechanisms of hydration effects on the structural dynamic and functional characteristics of photosynthetic membranes in various purple bacteria* // Eur. Biophys. J. Vol. 26. (1997). P. 461–470.
- [265] Aksyonov S. I., Nikolaev G. M., Klescheva N. A., Gembitsky P. A. *NMR spin-echo decay study of the influence of hydration on mobility and conformation of linear polyethylenimine* // Studia biophysica. Vol. 62. (1977). P. 127–159.
- [266] Aksyonov S. I., Svintitskikh V. A. *On mechanisms of biological action of boiled and thawed water* // Studia biophysica. Vol. 136, (1990), p. 197–200.
- [267] Andrew E. R., Bryant B., Rizvi T. *Proton magnetic relaxation investigation of proteins in solid state* // Chem. Phys. Lett. Vol. 95. (1983). P. 465–468.
- [268] Andrew E. R., Green T. J., Hecht M. J. R. *Solid state proton relaxation in biomolecular compounds* // J. Magn. Reson. Vol. 29. (1978). P. 331–339.
- [269] Barlow D. J., Thornton J. M. *The distribution of charged groups in proteins* // Biopolymers Vol. 25. (1986). P. 1717–1733.
- [270] Ben-Haim A. *Hydrophobic Interaction*. N. Y., Academic Press, 1980, 626 p.

- [271] Beckett R. P. *Some aspects of the water relations of lichens from habitats of contrasting water status studied using thermocouple psychrometry* // Ann. of Botany. V. 76. (1995). P. 211–217.
- [272] Berg H. *Possibility and problems of low frequency weak electromagnetic fields in cell biology* // Bioelectrochem Bioenerg. Vol. 38, (1995). P. 153–159.
- [273] Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissing H., Shindyalov I. H., Bourne P. E. *The protein data bank* // J. Nucleic Acid Res. Vol. 28. (2000). P. 236–242.
- [274] Bernal J. D. *The structure of water and its biological implications* // The state and movement of water in living organisms. N.Y.: Acad. Press, (1965). P. 17–51.
- [275] Bernal J. D., Fowler R. H. *A theory of water and ionic solution, with particular reference to hydrogen and hydroxyl ions* // J. Chem. Phys. Vol. 1. (1983). P. 515–548.
- [276] Bersani F. (ed.) *Electricity and Magnetism in Biology and Medicine*. Kluwer/Plenum, London, 1999.
- [277] Bewley J. D., Black M. *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination*. Vol. 1. Development, Germination and Growth, Springer Verlag, New York, Berlin, (1978).
- [278] Birktoft I., Blow D. W. *Structure of crystalline α -chymotrypsin. V. The atomic structure of tosyl- α -chymotrypsin at 2 Å resolution* // J. Mol. Biol. Vol. 68, (1972), P. 187–240.
- [279] Blank M. (ed.) *Electricity and Magnetism in Biology and Medicine*. San Francisco Univ. Press, San Francisco, CA, 1993.
- [280] Blears D. J., Danyluk S. S. *Proton wide line NMR spectra of hydrated proteins* // Biochim. Biophys. Acta. Vol. 154. (1968). P. 17–27.
- [281] Blinc K., Pirs J., Easwaran K., Ehrenberg L. *Nuclear magnetic relaxation study of tobacco virus solutions* // Biophys. J. Vol. 15. (1975). P. 622–625.
- [282] Bovey P. A. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy of proteins: the hydrogen bonding of water in bovine serum albumin solutions* // Nature. Vol. 192. (1961). P. 324–326.
- [283] Brandts J. P., Olivera R. J., Westort C. *Thermodynamics of protein denaturation. Effect of pressure on the denaturation of ribonuclease A* // Biochemistry. Vol. 9. (1970). P. 1030–1047.
- [284] Bronner F. (ed.) *Intracellular Calcium Regulation*. Wiley-Liss, N. Y., 1990, 480 p.
- [285] Bull H. B., Breese K. *Concentrations and partial volumes of proteins* // Arch. Biochem. and Biophys. Vol. 197. (1979). P. 199–204.
- [286] Chamorovsky S. K., Kononenko A. A., Petrov E. G., Pottosin I. I., Rubin A. B. *Effects of dehydration and low temperature on the oxidation of*

- high-potential cytochrome c by photosynthetic reaction centers in Ectothiorhodospira shaposhnikovii* // Biochim. Biophys. Acta Vol. 849. P. 402–410.
- [287] Chang A. M., Austin R. M. *Electron tunneling in cytochrome c* // J. Chem. Phys. Vol. 77. (1982). P. 5272–5283.
- [288] Chang D. C., Hazlewood C. F., Woessner B. D. *The spin-lattice relaxation times of water associated with early post mortem changes in skeletal muscle* // Biochim. Biophys. Acta. Vol. 457. (1976). P. 253–258.
- [289] Chivan M. M., Achiasha A. N., Shporer M. *The relationship between the transverse and longitudinal NMR relaxation rate of muscle water* // Biophys. J. Vol. 21. (1978). P. 127–156.
- [290] Citry N. *Conformational adaptability in enzymes* // Adv. Enzymol. Vol. 57. (1977). P. 597–648.
- [291] Conlon T., Outhred R. *Water diffusion permeability of erythrocytes in NMR technique* // Biochim. Biophys. Acta. V. 288. (1972). P. 354–361.
- [292] Cullis P. R., De Kruijff B. *Polymorphic phase behaviour of lipid mixtures as detected by ^{31}P NMR* // Biochim. Biophys. Acta Vol. 507. (1978). P. 207–218.
- [293] Cullis P. R., De Kruijff B. *Lipid polymorphism and functional role of lipids in biological membranes* // Biochim. Biophys. Acta Vol. 559. (1979). P. 399–420.
- [294] Drost-Hansen W., Clegg J. S. *Cell-associated water*. N. Y., Academic Press, 1979, 440 p.
- [295] Franks. *Hydrophobic interaction and the effects of hydrogen binding solutes on the structure of water* // Ann. N.Y. Acad. Sci Vol. 125, (1965). P. 277–289.
- [296] Frauenfelder H., Petsko G. A., Tsernoglou D. *Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics* // Nature. Vol. 280. (1979). P. 558–565.
- [297] Franzen J. S. (1962). *Hydrogen bonds between model peptide groups in solutions* // J. Amer. Chem. Soc. Vol. 84. P. 5461–5466.
- [298] Gapeev A. B., Yakushina V. S., Chemeris N. K., Fesenko E. E. *Modification of production of reactive oxygen species in mouse peritoneal neutrophils on exposure to low-intensity modulated millimeter wave radiation* // Bioelectrochem. Bioenerg. Vol. 46. (1998). P. 267–272.
- [299] Goldsack D. E., Chalifoux R. O. *Contribution of the free energy of mixing of hydrophobic side chain to the stability of the tertiary structure of proteins* // J. Theor. Biol. Vol. 59. (1975). P. 645–651.
- [300] Golovina E. A., Tikhonov A. N. *The structural difference between the embryos of viable and non-viable wheat seeds as studied with the EPR spectroscopy of lipid-soluble spin label* // Biochim. Biophys. Acta Vol. 1190. (1994). P. 385–392.

- [301] Grant E. H., Sheppard R. J., South G. R. *Dielectric behavior of biological macromolecules in solutions*. Oxford: Clarendon Press, (1978). 254 p.
- [302] Grosch L., Noack F. *NMR relaxation investigation of water mobility in aqueous bovine serum albumin solutions* // Biochim. Biophys. Acta. Vol. 453. (1976). P. 218–232.
- [303] Hallenga K., Koenig S. H. *Protein rotation relaxation as studies by solvent ^1H and ^2H magnetic relaxation* // Biochemistry. Vol. 15. (1976). P. 4255–4264.
- [304] Hill T. L. *Thermodynamics of small systems*. N. Y., Amsterdam: Benjamin. 1963, 171 p.
- [305] Hoekstra F. A., Crowe J. H., Crowe L. M. *Membrane behavior in drought and its physiological significance* // In: Recent Advance in the Development and Germination of Seeds. Ed. Tayorson R. V., Plenum Press, N. Y.: (1989). P. 77–88.
- [306] Jardetsky O., Roberts G. S. K. *NMR in molecular biology*. N. Y.: Academic. Press, 1981, 681 p.
- [307] Karplus M., Mc Cammon J. *Dynamics of proteins: elements and functions* // Annu. Rev. Biochem. Vol. 55. (1985). P. 265–300.
- [308] Karush P. *Heterogeneity of binding sites of bovine serum albumin* // J. Amer. Chem. Soc. Vol. 72. (1950). P. 2705–2715.
- [309] Kauzmann W. *Some factors in the interpretation of protein denaturation* // Adv. Protein Chem. Vol. 14. (1959). P. 1–65.
- [310] Kauzmann W., Moore K., Schulz D. *Protein densities from X-ray crystallographic coordinates* // Nature. Vol. 248. (1974). P. 447–449.
- [311] Klee C. B., Yanavan T. O. *Calmodulin* // Adv. Protein Chem. Vol. 55. (1982). P. 215–321.
- [312] Klotz I. M. *Comparison of molecular structure of proteins: helix content, distribution of apolar residues* // Arch. Biochem. Blophys. Vol. 158. (1970). P. 704–706.
- [313] Klyosov A. A., Van Viet Nguen, Beresin I. V. *The reaction of α -chymotrypsin and related proteins with ester substrate in non-aqueous solvents* // Europ. J. Biochem. Vol. 59. (1975). P. 3–7.
- [314] Kuntz J. D., Brassfeld T. S., Law C. P., Purcell G. V. *Hydration of macromolecules* // Science. Vol. 163. (1969). P. 1329–1331.
- [315] Kuntz J. D., Crippen G. M. *Protein densities* // Intern. J. Peptide and Protein Res. Vol. 15. (1979). P. 225–228.
- [316] Kuntz I. D., Kauzmann W. *Hydration of proteins and polypeptides* // Adv. Protein Chem. Vol. 28. (1974). P. 259–345.
- [317] Kurganov B. I., Loboda N. I. *Regulation of enzyme activity in absorptive enzyme systems* // J. Theor. Biol. Vol. 79. (1978). P. 281–301.

- [318] Lakowicz J. R., Weber G. *Nanosecond segmental mobilities of tryptophan residues in proteins observed by time-life resolved fluorescence anisotropies* // Biophys. J. Vol. 52. (1980). P. 600–601.
- [319] Linderstrom-Lang K., Schellman J. A. *Protein structure and enzyme activity* // Enzymes. 2nd ed. N. Y.: Academic. Press. Vol. 1., (1959). P. 445–510.
- [320] Lipari G., Szabo A. *Model-free approach to the interpretation of NMR relaxation in macromolecules, I. Theory and range of validity* // J. Amer. Chem. Soc. Vol. 104. (1982). P. 4546–4559.
- [321] Lipari G., Szabo A. *Model-free approach to the interpretation of NMR relaxation in macromolecules II. Analysis of experimental results* // J. Amer. Chem. Soc. Vol. 104. (1982a). P. 4559–4570.
- [322] Liu D. S., Astumian R. D., Tsong T. Y. *Activation of Na and K pumping modes of (Na,K) ATPase by an oscillating electric field* // J. Biol. Chem. Vol. 265. (1990). P. 7260–7267.
- [323] Lubas B., Wilczok T. *Spin-echo technique study of non-rotational hydration of DNA* // Biochim. et biophys. acta. Vol. 120. (1966). P. 427–439.
- [324] Lumry R. *Conformational mechanisms for free energy transduction in protein systems: old ideas and new facts* // Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol. 22. (1974). P. 46–75.
- [325] Markin V. S., Liu D., Gisma J., Strobel R., Rosenberg M. D., Isong T. Y. *Ion channel enzyme in oscillating electric field* // J. Membrane. Biol. Vol. 126. (1992). P. 137–145.
- [326] Mc Cammon J. *Protein dynamics* // Rep. Progr. Phys. Vol. 47. (1984). P. 1–46.
- [327] Meitrovitch H., Scheraga H. A. *Distribution of the hydrophilic, hydrophobic, neutral and ambivalent amino acids in the interior and exterior layers of native proteins* // Macromolecules. Vol. 15. (1980). P. 1406–1414.
- [328] Miller S., Janin J., Lesk A. M., Chothea C. *Interior and surface of monomeric proteins* // J. Molec. Biol. Vol. 196. (1987). P. 641–656.
- [329] Moelwyn-Hughes E. A. *Physical Chemistry*, London, New York, Paris, Pergamon Press, 1961.
- [330] Nishikawa K., Ooi T. *Correlation of amino acid composition of a protein to its structure and biological character* // J. Biochem. Vol. 91. (1982). P. 1821–1824.
- [331] Nuccitelli R., Deamer D. W. (Eds.) *Intracellular pH: Its Measurement, Regulation and Utilization in Cellular Control*, New York, Allen R. Liss, (1982).
- [332] Nuccitelli K., Heiple J. M. *Summary of the evidence and discussion concerning the involvement of pH in the control of cellular functions, In Intracellular pH: Its Measurement, Regulation and Utilization in Cellular*

- Control*, R. Nuccitelli, D. W. Deamer (Eds), New York, Allen R. Liss, (1982). P. 567–586
- [333] Obrink B., Lindstrom H., Svenning N.G. *Calcium requirement for a reversible binding of membrane proteins to rat liver plasma membranes* // FEBS Letters, Vol. 70. (1976). P. 28–32.
- [334] Ohno K. *ESR imaging and its applications* // Appl. Spectroscopy Vol. 22. (1986).
- [335] Patel D.J., Cannel L.L. *Nuclear magnetic resonance studies of slowly exchanging peptide protons in cytochrome C in aqueous solutions* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Vol. 75. (1976). P. 1398–1402.
- [336] Poole P.L., Finney J.L. *Sequential hydration of dry proteins: a direct difference IR-investigation a sequence homologue lysozyme and α -lactalbumin* // Biopolymers. Vol. 23. (1984). P. 1647–1666.
- [337] Privalov P.L. *Stability of proteins: small globular proteins* // Adv. Protein Chem. Vol. 33. (1979). P. 167–241.
- [338] Privalov P.L., Mateo P.L., Khechinashvili N.N. et al. *Comparative thermodynamic study of pepsinogen and pepsin* // J. Mol. Biol. Vol. 152. (1981). P. 445–464.
- [339] Remish D., Bulychev A.A., Kurella G.A. *The electrical and chemical components of the protonmotive force in chloroplast as measured with capillary and pH-sensitive microelectrodes* // Biochim. Biophys. Acta Vol. 852, (1986). P. 68–73.
- [340] Riznichenko G. Yu., Plusnina T. Yu., Aksyonov S. I. *Modelling of the effect of a weak electric field on a nonlinear transmembrane ion transfer system* // Bioelectrochem. Bioenerg. Vol. 35. (1994). P. 39–47.
- [341] Riznichenko G. Yu., Vorob'eva T.N., Khrabrova E.N. *Identification of kinetic parameters of plastocyanin and P700 interaction in chloroplasts and pigment complexes of photosystem I* // Photosynthetica Vol. 24. (1990). P. 495–501.
- [342] Rotman B., Papermaster B.W. *Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic agents* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol. 55. (1966). P. 134–141.
- [343] Rupley J.A. *Susceptibility to attack by proteolytic enzymes* // Meth. Enzymol. Vol. 11. (1967). P. 905–917.
- [344] Simon E.W. *Membranes in dry and imbibing seeds* // Dry biological systems. N. Y., London, Academic press. (1978). P. 205–224.
- [345] Smirnov A. I., Golovina H. A., Yakimchenko O. E., Aksyonov S. I., Lebedev Ya. S. *In vivo seed investigation by electron paramagnetic resonance spin probe technique* // J. Plant Physiol. Vol. 140. (1992). P. 447–452.

-
- [346] Snozzi M., Bachofen R. *Characterisation of reaction centers and their phospholipids from Rhodospirillum rubrum* // Biochim. Biophys. Acta Vol. 546. (1979). P. 236–247.
- [347] Sokolov Z.N., Matorin D.N., Aksyonov S.I., Bulychiev A.A., Venedictov P.S. *Effects of H₂O for D₂O substitution on stability and functional activity of the photosynthetic membranes of green plants* // Stud. biophysica. Vol. 87. (1982). P. 29–39.
- [348] Squire P.G., Himmel M.E. *Hydrodynamics on protein hydration* // Arch. Biochem. and Biophys. Vol. 79. (1979), p. 173–174.
- [349] Stenvert N.L., Kingswood K. *An auto radiographic demonstration of the penetration of water into wheat during tempering* // Cereal Chem. Vol. 53. (1976). P. 141–149.
- [350] Sussman A.S., Halvorson H.O. *Spores: Their Dormancy and Germination*. N.Y.: Harper and Row, 1966, 355 p.
- [351] Tanford O. *The Hydrophobic Effect*. 2nd ed, N.Y.: Wiley Interscience. (1980). 233 p.
- [352] Tasaki I. *Physiology and electrochemistry of nerve fibers*. // Biophys. and Bioeng. Ser.; N. Y.; London. Vol. 5. (1982). 348 p.
- [353] Tiunistra R., Goodman E.M., Greenbaum B. *Protein kinase C activity in HL60 cells following exposure to magnetic fields and phorbol ester* // Bioelectromagnetics Vol. 19. (1998). P. 469–476.
- [354] Vandercool J., Erecinska M., Chance B. *Cytochrome c interaction with membranes. 1. Use of a fluorescent chromatophore in the study of cytochrome c interaction with artificial and mitochondrial* // Arch. Biochem. Biophys. Vol. 154. (1973). P. 219–229.
- [355] Vandercool J., Erecinska M. *Cytochrome c interaction with membranes. Absorption and emission spectra and binding characteristics of iron-free cytochrome c* // Eur. J. Biochem. Vol. 60. (1975). P. 199–207.
- [356] Veselova T.V., Veselovsky V.A., Rubin A.B., Bocharov P.Z. *Delayed luminescence of air-dry soybean seeds as a measure of their viability* // Physiol. Plant. Vol. 65. (1985). P. 495–497.
- [357] Waliczek J., Liburdy R., Nonthermal P. *60 Hz sinusoidal magnetic field exposure enhances Ca uptake in rat thymocytes. Dependence on nitrogen activation* // FEBS Letters Vol. 271. (1990). P. 157–160.
- [358] Warnke U. *Survey of some working mechanisms of pulsating electromagnetic fields* // Bioelectrochem. Bioenerg. Vol. 27. (1992). P. 317–325.
- [359] Weber B.H., Storm M.C., Boyer P.D. *An assesment of exchangeability of water molecules on the interior of chymotrypsinogen in solutions* // Arch. Biochem. and Biophys. Vol. 165. (1974). P. 1–6.

- [360] Wood P. J. B., Nickols B. M., James A. T. *The lipid and fatty acid metabolism in photosynthetic bacteria* // Biochim. Biophys. Acta Vol. 106, (1965). P. 261–270.
- [361] Yeagle P. L. *Phosphorus NMR in membranes* // In Biological Magnetic-Resonance. Berliner L. P., Reuben J. (Eds) N. Y., Plenum Press, (1990). P. 1–34.
- [362] Zaslavsky B. Yu., Gulseva N. D., Rogozhin S. V., Gasanov A. A., Masimov A. A. *An experimental approach to evaluation of the relative hydrophobic character of biological liquids and tissues* // Mol. and Cell. Biochem. Vol. 65. (1985). P. 125–130.

Аксенов Сергей Иванович

ВОДА И ЕЕ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Дизайнер М. В. Ботя
Технический редактор А. В. Широбоков
Компьютерная верстка Д. П. Вакуленко
Корректор М. Г. Пушель

Подписано в печать 22.03.2005. Формат 60 × 84¹/₁₆.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 12,32. Уч. изд. л. 12,89.
Гарнитура Таймс. Бумага офсетная №1. Заказ №236.

АНО «Институт компьютерных исследований»
426034, г. Ижевск, ул. Университетская, 1.
Лицензия на издательскую деятельность ЛУ №084 от 03.04.00.
<http://red.ru> E-mail: borisov@red.ru
