

А.Б.Рубин

БИОФИЗИКА

В двух книгах

Книга 1

Теоретическая биофизика

Допущено Министерством высшего и среднего специального образования СССР в качестве учебника для студентов биологических специальностей высших учебных заведений



МОСКВА «ВЫСШАЯ ШКОЛА» 1987

ББК 28. 071

Р 82

УДК 577. 3

Рецензенты:

кафедра биофизики Воронежского государственного университета им. Ленинского комсомола (зав. кафедрой — д-р биол. наук В. Г. Артюхов);
чл.-кор. АН СССР, проф. М. В. Волькенштейн (Институт молекулярной биологии АН СССР)

Рубин А. Б.

Р 82 **Биофизика: В 2-х кн.: Учеб. для биол. спец. вузов.**
Кн. 1. Теоретическая биофизика.—М.: Высш. шк.,
1987.—319 с.: ил.

Книга — фундаментальный учебник по биофизике, в котором излагаются основы современной биофизической науки. Книга первая содержит главы I—XIV, книга вторая — главы XV—XXX. В первой книге учебника даны теоретические основы современной биофизики. Значительное место уделено современным проблемам математического моделирования биологических процессов на разных уровнях организации живого. Рассмотрены физические особенности, динамические и электронные свойства структурной единицы живого — макромолекулы, а также физико-химические механизмы трансформации энергии в биоструктурах.

2001040000 (4309000000)—267

Р _____ 159—87

001(01)—87

ББК 28.071
57.04

Предисловие

Настоящий учебник написан в соответствии с программой курса «Биофизика» для студентов всех специальностей биологических и биолого-почвенных факультетов университетов. В основу учебника положен материал лекций по общему курсу «Биофизика», которые автор читает на биологическом факультете МГУ с 1976 г.

Быстрое развитие биофизики сопровождается проникновением ее в различные области биологии и тесным взаимодействием со смежными дисциплинами — физикой, химией, математикой, физической химией. Именно этим определяется вклад биофизики в решение современных биологических проблем.

Предмет биофизики достаточно сложен и многогранен, и его изложение требует привлечения не только материалов из разных разделов биологии, но и широкого использования современных методов и представлений физики, математики, физической химии. В этом состоит одна из главных трудностей преподавания биофизики. От современного специалиста-биофизика требуется одновременное владение фундаментальными понятиями и логическими концептуальными схемами, характерными для биологии и физики, т. е. умение мыслить «биологически» и «физически».

Пути решения этой задачи необходимо рассматривать в свете современного состояния проблемы фундаментальности и специализации высшего образования. Быстрый темп развития науки и производства, интеграция и возникновение новых (пограничных) отраслей науки приводят к тому, что запаса конкретных знаний, полученных в вузе, хватает сейчас специалисту на весьма ограниченное время. Поэтому успешная работа после окончания вуза зависит от того, насколько выпускник может постоянно обновлять запас первоначальных знаний и повышать тем самым свой профессиональный уровень. Основной целью высшего образования является сейчас развитие творческого мышления, умения самостоятельно применять и целенаправленно пополнять свои знания, быстро ориентироваться в решении новых проблем. В свою очередь, это зависит от степени усвоения основ науки и принципов их применения в научных исследованиях и производстве.

В настоящее время преподавание биофизики в университетах осуществляется на основе биологического или физического образования. Однако в любом случае целью общего курса должно быть последовательное изложение основ биофизики как самостоятельной науки, имеющей свой предмет и методы исследования, собственную теоретическую концептуальную базу и области приложения. Задача общего курса состоит также в выявлении единства в многообразии биологических явлений путем раскрытия общих молекулярных механизмов взаимодействий, которые лежат в основе биологических процессов.

В предыдущие годы появился ряд обширных монографий, отражающих состояние разных разделов современной биофизической науки. Достаточно указать на серию книг М. В. Волькенштейна по проблемам биофизики: «Биофи-

зика» (1981), «Общая биофизика» (1978), «Молекулярная биофизика» (1975), монографию Л. А. Блюменфельда «Проблемы биологической физики» (1977), книгу Ю. М. Романовского, Н. В. Степановой, Д. С. Чернавского «Математическое моделирование в биофизике» (1984), В. С. Маркина, Ю. А. Чизмадзе «Индукцированный ионный транспорт» (1974) и ряд других, которые успешно используются при подготовке специалистов-биофизиков. Однако для преподавания биофизики необходим учебник, где последовательно излагаются теоретические представления современной биофизики и результаты их применения в анализе важнейших биологических процессов в соответствии с современной обширной и насыщенной программой преподавания биофизики в университетах. Учебное пособие «Биофизика», написанное коллективом авторов под руководством Б. Н. Тарусова (1968), было, по существу, первой книгой в отечественной литературе, охватившей всю программу по биофизике для биологических факультетов того времени. Однако за прошедшие два десятилетия программа существенно изменилась и усложнилась.

В свете современных достижений биофизической науки изложение логически обоснованного курса биофизики следует начинать с рассмотрения теоретических основ биофизики — вопросов кинетики, термодинамики, математического моделирования биологических систем, основ молекулярной (квантовой) биофизики. Только затем можно с достаточным основанием переходить к применению теоретических концепций в анализе конкретных биологических процессов, к вопросам, посвященным их первичным молекулярным механизмам.

Указанная последовательность изложения биофизики наиболее рациональна и логически обоснована для учебного курса. Деление биофизики, принятое Международным союзом чистой и прикладной биофизики, основано на принципе структурной организации объектов. Оно имеет иные, не учебные задачи; его цель — максимально компактное изложение новейшего текущего материала исследований и специальное выделение новых разработок, имеющих прикладное значение.

Все сказанное предопределяет и построение современного общего курса биофизики, который подразделяется на две основные части: первую — теоретическую биофизику, включающую биофизику сложных систем (в свою очередь, подразделяется на кинетику биологических процессов и термодинамику биологических процессов) и молекулярную биофизику (строение и электронные свойства биополимеров); вторую — биофизику клеточных процессов, включающую биофизику мембранных процессов, биофизику фотобиологических процессов и радиационную биофизику. Вторая часть посвящена биофизике конкретных биологических процессов, протекающих на разных структурных уровнях организации живого. Поскольку элементарной ячейкой живого является клетка, эту часть и целесообразно именовать биофизикой клеточных процессов.

В настоящем учебнике широко используются не только сведения из существующих университетских курсов по химии, физике, математике, физической химии для студентов-биологов, но и дается достаточно подробное изложение необходимого для понимания основ биофизики дополнительного материала, который не нашел своего отражения в соответствующих курсах. Рассмотрение этих вопросов основано на биологических примерах и приводится по ходу изложения основного материала учебника.

Достаточно подробное изложение дает возможность читателю войти в круг идей, составляющих теоретический фундамент современной биофизики. Вместе с тем автор счел возможным не включать в настоящее издание материал по таким еще окончательно не оформившимся разделам биофизики, как биофизика эволюционных процессов, биофизика процессов развития. Также не включен

раздел по радиационной биофизике, которому посвящен отдельный учебник профессора кафедры биофизики биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова Ю. Б. Кудряшова (*Ю. Б. Кудряшов, Е. С. Беренфельд. Основы радиационной биофизики. М., 1982*).

В обсуждении материала для учебника и подготовке самой рукописи автору оказали огромную помощь сотрудники кафедры биофизики биологического факультета МГУ А. А. Булычев, И. И. Иванов, Г. Ю. Ризниченко, А. С. Соболев, Г. Я. Фрайкин, К. В. Шайтан. Сотрудница Института биофизики АН СССР А. Е. Букатина написала гл. XXV. Большую работу по подбору, подготовке и критической оценке материалов по отдельным разделам учебника провели сотрудники кафедры С. И. Аксенов, Г. П. Борисевич, П. С. Венедиктов, Т. Н. Воробьева, Б. А. Гуляев, О. Р. Кольс, А. А. Кононенко, Т. Е. Кренделева, В. З. Пашенко, К. Н. Тимофеев, И. В. Упоров, С. К. Чаморовский, В. П. Шинкарев. Без их помощи написание данного учебника не было бы возможным. Автор приносит им свою глубокую благодарность.

В процессе работы над учебником автор пользовался ценными советами и замечаниями, дружеской помощью Л. А. Блюменфельда, М. В. Волькенштейна, Д. С. Чернавского, Ю. А. Чизмадзе, М. А. Островского, А. Р. Хохлова, В. И. Иванова, Н. К. Балабаева, Б. Н. Белинцева, Н. Г. Есиповой, М. Д. Франк-Каменецкого, Э. М. Трухана, Г. Б. Завильгельского. Автор выражает им свою искреннюю признательность.

Автор искренне благодарит В. М. Кобрина, с которым его связывает совместная работа над экранизацией и художественной визуализацией общего курса биофизики, за идеи по художественному оформлению учебника.

Автор

Введение

Биофизика — наука о наиболее простых и фундаментальных взаимодействиях, лежащих в основе биологических явлений. Теоретическое построение и модели биофизики основаны на физических понятиях энергии, силы, типов взаимодействия, на общих понятиях физической и формальной кинетики, термодинамики, теории информации. Эти понятия отражают природу основных взаимодействий и законов движения материи, что, как известно, составляет предмет физики — фундаментальной естественной науки. В центре внимания биофизики как биологической науки лежат биологические процессы и явления. Основная тенденция современной биофизики — проникновение на самые глубокие, элементарные уровни, составляющие молекулярную основу структурной организации живого.

Эта тенденция полностью отвечает известному положению В. И. Ленина о том, что прогресс в современном естествознании состоит в приближении «к таким однородным и простым элементам материи, законы движения которых допускают математическую обработку»¹.

На современном этапе развития биофизики произошли принципиальные сдвиги, связанные прежде всего с бурным развитием биофизики сложных систем и молекулярной биофизики. Именно в этих областях, занимающихся закономерностями динамического поведения биологических систем и механизмами молекулярных взаимодействий в биоструктурах, получены общие результаты, на основании которых в биофизике сформировалась собственная теоретическая база. Теоретические модели, разрабатываемые в таких разделах, как кинетика, термодинамика, теория регуляции биологических систем, строение биополимеров и их электроинные и конформационные свойства, в биофизике составляют основу для анализа конкретных биологических процессов.

Развитие и становление биофизики как пограничной науки, стоящей на стыке биологии, физики, химии и математики, проходило через ряд стадий. Уже на начальных этапах развития биофизика была тесно связана с идеями и методами физики, химии, физической химии, математики. Достаточно напомнить о применении физико-химической теории растворов электролитов, принципов химической кинетики, представлений коллоидной химии к анализу некоторых биологических процессов, что дало в начале XX в. ряд ценных результатов. С развитием биофизики в биологию проникли и точные экспериментальные методы исследований (спектральные, изотопные, радиоспектроскопические).

Основной итог начального периода развития биофизики — это вывод о принципиальной приложимости в области биологии основных законов физики как фундаментальной естественной науки о законах движения материи.

¹ Ленин В. И. Полн. собр. соч. Т. 18. С. 326.

Важное общеметодологическое научное значение для развития разных областей биологии имеют полученные в этот период экспериментальные доказательства закона сохранения энергии (первый закон термодинамики), утверждение принципов химической кинетики как основы динамического поведения биосистем, концепции открытых систем и второго закона термодинамики в биологических системах, наконец, вывод об отсутствии каких-либо особых «живых» форм энергии. Все это во многом повлияло на развитие биологии и наряду с достижениями биохимии и успехами в изучении структуры биополимеров способствовало формированию ведущего современного направления экспериментальной биологической науки — физико-химической биологии, — в котором биофизика занимает важное место.

Идеи и методы биофизики не только находят широкое применение при изучении биологических процессов на макромолекулярном и клеточном уровнях, но и распространяются, особенно в последние годы, на популяционный и экосистемный уровни организации живой природы.

Основное содержание биофизики составляют нахождение общих принципов биологически значимых взаимодействий на молекулярном уровне, раскрытие их природы в соответствии с законами современной физики, химии и математики и разработка на основе этого исходных обобщенных понятий, адекватных описываемым биологическим явлениям.

Формулировка собственных исходных теоретических понятий характерна для самостоятельных развитых наук, имеющих свою концептуальную базу. Специфика биологических закономерностей, полностью раскрывающихся на высших уровнях организации развитой биологической системы, тем не менее проявляется уже на низших молекулярных уровнях живого. Поэтому модели в биофизике должны быть основаны на непосредственных, полученных в прямых экспериментах, сведениях о реальных молекулярных свойствах биологического объекта, а не представлять собой результат простого перенесения из физики в биологию готовых схем похожих внешне процессов. Отсюда вытекает принципиальная роль новых методов в биофизике, с помощью которых можно получать прямую информацию о механизмах молекулярных процессов в интактных биологических системах. Такими методами на сегодня являются различные оптические методы, ЯМР- и ЭПР-спектроскопия, γ -резонансная спектроскопия, различные электрометрические методы, микроэлектродная техника, методы хемилюминесценции, лазерной спектроскопии, метод меченых атомов и др.

Важнейшей особенностью является то, что построение моделей в биофизике требует такой модификации идей смежных точных наук, которая равносильна выработке новых понятий в этих науках в применении к анализу биологических процессов. Биологические системы сами являются источником информации, которая стимулирует развитие некоторых областей физики, химии и математики.

Результаты биофизического исследования приобретают важное биологическое значение, когда параметры первичных молекулярных механизмов удаётся непосредственно связать с особенностями конкретных биологических процессов и явлений. Этим определяется плодотворность неразрывной традиционной связи биофизики с фундаментальными биологическими дисциплинами, прежде всего физиологией и биохимией, а также с экологией и генетикой. Опираясь в своей проблематике и исследовательских подходах на прочный биологический и физический фундамент, биофизика вносит достойный вклад в решение целого ряда важнейших проблем современной биологии: регуляции биологических систем и управления ими; молекулярной динамики и механизмов функционирования биополимеров (ферментативный катализ); трансформа-

ции энергии в биоструктурах; мембранных транспортных процессов; мышечного сокращения; биоконверсии солнечной энергии.

Исходя из этих общих положений, рассмотрим основные направления современной биофизики, нашедшие свое отражение в учебнике. Справедливость принципов химической кинетики в метаболических процессах открывает широкие возможности математического моделирования с помощью обыкновенных дифференциальных уравнений. На этом этапе было получено много важных результатов, в основном в области моделирования физиолого-биохимических процессов, а также при моделировании динамики роста клеток и численности популяций в экологических системах.

Однако если число переменных велико, а уравнения включают нелинейные члены, как это и имеет место в моделях биологических процессов, то поиски точных аналитических решений исходной системы дифференциальных уравнений встречают серьезные математические трудности. Ясно и то, что далеко не всегда сами по себе решения уравнений дают ответ на вопрос об общих динамических свойствах и механизмах регуляции сложных систем. В этом отношении принципиальное значение в развитии математического моделирования сложных биологических процессов имел отказ от идеи обязательного нахождения точных аналитических решений соответствующих уравнений. Вместо этого на первый план выступают качественные методы анализа дифференциальных уравнений, которые позволяют раскрыть общие динамические особенности биологических систем. Сюда относятся прежде всего свойства стационарных состояний, их число, устойчивость, возможность переключения из одного режима в другой, наличие автоколебательных режимов.

На этой основе были развиты представления об иерархии времен и о «минимальных» и адекватных моделях, достаточно полно отражающих основные свойства объекта. Был также развит параметрический анализ динамического поведения систем. На современном этапе в моделях учитываются также изменения пространственной структуры биологической системы путем введения членов, отражающих явления переноса в активных средах. На первый план сейчас выступает параметрический анализ базовых моделей, отражающих те или иные стороны самоорганизации биологических систем во времени и пространстве. Эти исследования требуют уже применения развитых и достаточно сложных математических методов. Кроме того, все большее значение приобретает использование вероятностных моделей в биологии, которые отражают влияние стохастических факторов на детерминистские процессы в биологических системах. Бифуркационная зависимость динамического поведения системы от критических значений параметров отражает возникновение в системе динамической информации, которая реализуется при смене режима функционирования.

В этом отношении необходимо учитывать характер структурно-функциональной организации биосистем, в которых наиболее важные молекулярные превращения происходят в активных макромолекулярных комплексах. Именно на этом уровне структурной организации живого влияние внешних факторов (температура, рН, концентрации веществ во внешней среде) может таким образом изменить значения констант скоростей внутримолекулярных превращений, что это вызывает переход системы через бифуркационную точку со сменой режима устойчивости.

В этой связи предстоит большая работа по осмысливанию физических взаимодействий составных структурных элементов, отраженных в базовых математических моделях. В целом развитие единого молекулярно-кинетического описания является актуальной проблемой биофизики, которая требует разработки исходных базовых понятий. Так, в области термодинамики

необратимых процессов понятие химического потенциала, зависящего от общей концентрации какого-либо компонента, и, строго говоря, понятие энтропии уже несправедливы для гетерогенных систем, далеких от равновесия. В активных комплексах внутримолекулярные превращения в первую очередь зависят от характера их организации, а не от суммарной концентрации отдельных составляющих компонентов. Это требует разработки новых критериев устойчивости и направленности необратимых процессов в гетерогенных неравновесных системах.

В области молекулярной биофизики основу для понимания механизмов функционирования макромолекул составляют современные представления об электронно-конформационных взаимодействиях (ЭКВ) (М. В. Волькенштейн). Трансформация энергии и появление продуктов реакции в комплексах достигаются не за счет соударения реагентов, как это происходит по обычному механизму свободных соударений в растворах, а в результате внутримолекулярных взаимодействий отдельных частей макромолекулы. Отсюда логически вытекают биофизические представления о своеобразии макромолекулы как физического объекта, сочетающего в себе взаимодействия по статистическим и механическим степеням свободы (Л. А. Блюменфельд, Д. С. Чернавский). Введенное в биофизику понятие конформона (М. В. Волькенштейн) отражает эту фундаментальную и общую особенность взаимодействий при функционировании биологических макромолекул.

В настоящее время интенсивно разрабатываются физические модели движения конформона, где учитываются особые свойства белка, отличающиеся от свойств твердого тела и жидкости. Так, в модели ограниченной диффузии показано, что связь функциональной активности и конформационной динамики белка определяется характером релаксационных процессов по внутримолекулярным и конформационным координатам с существенно разными скоростями. Задача состоит в том, чтобы найти принципы корреляции локальных и микроконформационных изменений, приводящих в конечном итоге к детерминированным внутримолекулярным конформационным сдвигам, которые имеют вполне определенный функционально-биологический смысл.

Концепция ЭКВ успешно развивается и в современных моделях туннельного переноса электронов, тесно сопряженного с колебательными и конформационными степенями свободы. Перенос электрона между переносчиками в активном комплексе приводит к разным по своим масштабам структурным сдвигам в белковой части. С одной стороны, электронно-колебательные взаимодействия делают туннельный перенос электрона практически необратимым. В то же время ЭКВ способствуют достижению активных контактных состояний переносчиков, где возможен эффективный прямой транспорт электронов.

Макромолекулы можно рассматривать как своего рода молекулярные машины, служащие для преобразования одного вида энергии в другой на основе концепции белок — машина (Д. С. Чернавский, Л. А. Блюменфельд). Характерной чертой этих «машин» является трансформация различных видов энергии в результате взаимодействий в пределах одной макромолекулы. Так, функционирование реакционного центра фотосинтеза сопровождается конформационными изменениями его макромолекулярных компонентов — дает начало цепи переходов энергии электронного возбуждения в энергию разделенных зарядов и энергию поляризации белковой части, а также в энергию трансмембранного электрохимического потенциала и энергию химических связей АТФ. Таким образом, уже на макромолекулярном уровне особое значение приобретает принцип единства функциональной и структурной организации, столь характерный для целостных живых систем.

Конечно, предстоит еще большая работа по разработке физических мо-

делей внутримолекулярной динамики макромолекул. Однако уже сейчас ясно, что принцип ЭКВ позволяет с единых общенаучных позиций рассмотреть функционирование различных молекулярных машин, казалось бы, далеких друг от друга по своей биологической роли. Специфика и общность молекулярных механизмов фотобиологических процессов состоит в том, что первичный фотофизический акт использования энергии электронного возбуждения хромофора происходит при непосредственном участии его белкового окружения и ведет к созданию локального конформационно-напряженного состояния. Это состояние затем распространяется на всю макромолекулу, причем возникающие функционально значимые изменения есть результат конформационных превращений в белковой части фоточувствительного хромопротеина.

Между первичными фотобиологическими превращениями в хромопротеине и внутримолекулярными превращениями в фермент-субстратном комплексе нет принципиальной разницы. Концепция внутримолекулярных ЭКВ привлекается сейчас и для объяснения молекулярных механизмов работы АТФ-синтазы, а также переноса ионов через биологические мембраны. Это еще раз иллюстрирует плодотворность биофизического метода анализа и построения обобщенных моделей физических взаимодействий, которые лежат в основе явлений, разных в биологическом отношении, но родственных между собой по глубинным молекулярным механизмам.

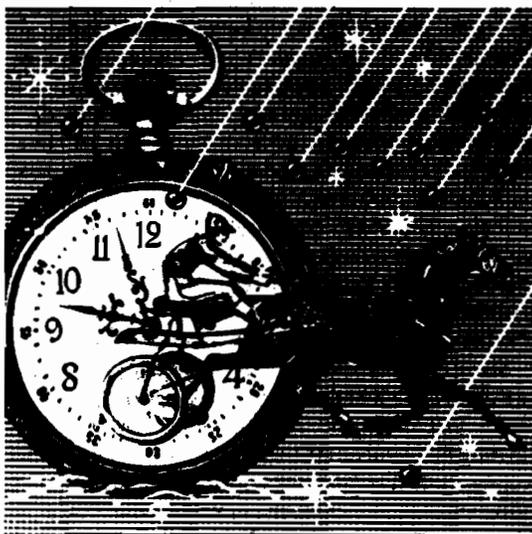
Итак, современный этап развития биофизики характеризуется тем, что на первый план выступает проблема формулировки исходных теоретических понятий, отражающих фундаментальные механизмы взаимодействий в биологических системах на молекулярном уровне. Вместе с тем специфика биологических систем проявляется в своеобразии физических механизмов молекулярных процессов. Принципиальная особенность заключается в том, что характерные параметры элементарных взаимодействий могут изменяться в зависимости от условий их протекания в организме. Например, эффективность скорости отдельных элементарных актов переноса электрона в реакционном центре фотосинтеза не только изменяется направленно в течение жизненного цикла развития, но и различна у сортов растений, отличающихся по физиолого-биохимическим показателям и продуктивности. Это означает, что молекулярные процессы и механизмы взаимодействий не только зависят от локального окружения в биологических системах, но и сами являются объектом направленного физиолого-биохимического регулирования. Здесь видна определяющая роль биологических закономерностей, проявляющаяся уже на низших уровнях организации живого. Одновременно это создает неразрывную связь между молекулярными взаимодействиями и характером биологических явлений, развивающихся на их основе. Именно поэтому изучение глубоких биофизических механизмов в связи с физиолого-биохимическими особенностями биологических объектов создает базу и для практического применения результатов биофизических исследований. Достаточно сослаться на разработку различных методов ранней диагностики состояния биологических систем, основанных на данных о молекулярных механизмах биологических процессов, которые находят свое широкое приложение в различных областях медицины и сельского хозяйства.

Изложенные выше соображения приводят к выводу о том, что построение и расположение разделов биофизической науки должны отражать связь между исходными теоретическими понятиями в биофизике и областью их применения в биологии. Это определяет единую логическую схему и в изложении основ биофизики.

Часть первая
Биофизика сложных систем

I

Кинетика биологических процессов



I

Качественные методы
исследования динамических моделей
биологических процессов

II

Типы динамического поведения
биологических систем

III

Кинетика ферментативных процессов

IV

Вероятностные модели в биофизике

В основе метаболических процессов биологической системы лежит сложная совокупность реакций, организованных определенным образом в пространстве и времени. Кинетика биологических процессов изучает поведение во времени самых разнообразных процессов, присущих различным условиям живой материи: биохимические превращения в клетке, генерацию электрического потенциала на биологических мембранах, биологические ритмы, процессы накопления биомассы или размножения вида, взаимодействия популяций живых организмов в биоценозах.

Сложный процесс в биологической системе обычно имеет характер многоступенчатых превращений и может рассматриваться как совокупность отдельных стадий (элементарных звеньев), образующих сетку сопряженных последовательных, параллельных и циклических реакций. В основе совокупности процессов в целостной клетке или организме лежат кинетически относительно простые биохимические реакции и физико-химические процессы, для которых справедливы законы физической химии. В частности, скорости каждой из реакций существенно зависят от условий ее протекания: температуры, рН, свойств катализаторов реакций и т. п.

Функционирование целостной биологической системы есть результат взаимодействия составляющих ее элементов и отдельных процессов. Выяснение принципов регуляции такой системы представляет собой задачу, которая может быть решена лишь с применением правильно выбранных математических методов. В такой постановке описание кинетического поведения сложной системы сводится к построению и анализу математической модели, в которой скорости изменения концентраций различных составных компонентов были бы выражены через скорости отдельных элементарных реакций их взаимодействия. Ясно, что построение адекватной модели возможно лишь с привлечением конкретных данных и представлений о механизмах сложных биологических процессов; это достигается лишь на определенном уровне экспериментального исследования.

Так, математические модели биохимических циклов метаболизма основаны на детальном знании последовательности превращений веществ и оценке экспериментальных значений концентраций и констант скоростей их взаимодействий. Самостоятельное изучение динамических свойств моделей позволяет сделать заключение об особенностях функционирования исходной биологической системы. Адекватная математическая модель «живет» по своим внутренним законам, познание которых позволяет выявить такие характерные черты моделируемой биологической системы, которые недоступны качественному исследованию.

Речь идет о том, чтобы модель отражала действие наиболее существенных факторов, ответственных за основные динамические свойства биологической системы. Здесь можно пользоваться иерархическим характером организации живых систем, которые состоят из ряда взаимодействующих, но относительно автономных подсистем. Анализ таких моделей позволяет понять общие закономерности динамической организации и выявить типы динамического поведения биологических систем. Результаты моделирования составляют основу управления биологическими процессами.

Качественные методы исследования динамических моделей биологических процессов



§ 1. Общие принципы описания кинетического поведения биологических систем

Кинетическую систему можно охарактеризовать как совокупность переменных и параметров, выражаемых через измеримые величины, которые в каждый момент времени принимают определенные числовые значения. Параметры — это величины, которые поддерживаются неизменными в течение времени наблюдения над системой; переменные — величины, которые изменяются с течением времени.

В разных биологических системах в качестве переменных могут выступать различные измеряемые величины: в биохимии — это концентрации промежуточных веществ, в микробиологии — число микроорганизмов или их суммарная биомасса, в экологии — численность вида, в биофизике мембранных процессов — мембранные потенциалы и т. д. Параметрами могут служить температура, влажность, рН, электрическая проводимость мембраны.

Если допустить, что в системе имеется n различных компонентов, которые для определенности будут считаться химическими соединениями, претерпевающими метаболические превращения, то каждое i -е соединение из общего их числа n характеризуется значением концентрации c_i ($i=1, 2, \dots, n$), которое может изменяться со временем $c_i=c_i(t)$ в результате взаимодействия i -го соединения с любым из остальных ($n-1$) веществ. Такого предположения достаточно для написания общей математической модели, представляющей собой систему из n дифференциальных уравнений:

$$dc_1 / dt = f_1(c_1, \dots, c_n);$$

.....

(I.1.1)

$$dc_n / dt = f_n(c_1, \dots, c_n),$$

где $c_1(t), \dots, c_n(t)$ — неизвестные функции времени, описывающие переменные системы (например, концентрации веществ); dc_i/dt — скорости изменения этих переменных; f_i — функции, зависящие от внешних и внутренних параметров системы. Полная модель типа (I.1.1) может содержать большое число уравнений, в том числе нелинейных. С помощью современных быстро-

действующих ЭВМ находят частные решения такой системы при конкретных значениях ее параметра. Найти общее решение в аналитическом виде сравнительно легко удается лишь для небольшого класса систем дифференциальных уравнений, обычно линейных.

Однако процессы, происходящие в биологических системах, как правило, существенно нелинейны, соответственно нелинейны и модели этих процессов. Так, уже скорость простейшего бимолекулярного взаимодействия описывается математически в виде произведения концентраций реагентов. В модели таких реакций правые части уравнений содержат нелинейные члены, что может создать математические трудности в их решении.

На многие существенные вопросы, касающиеся качественного характера поведения системы, в частности устойчивости стационарных состояний и переходов между ними, колебательных режимов и пр., отвечают методы качественной теории дифференциальных уравнений. Эти методы позволяют выявить важные общие свойства модели, не прибегая к нахождению в явном виде неизвестных функций $c_1(t)$, $s_2(t)$, $c_n(t)$. Такой подход дает хорошие результаты при исследовании моделей, состоящих из небольшого числа уравнений и отражающих наиболее важные динамические свойства системы.

Гетерогенный характер структурно-функциональной организации биологических систем воплощается в динамической гетерогенности основных процессов метаболизма. В кинетическом отношении это положение находит свое отражение в том, что различные функциональные процессы в биологических системах и их подсистемах сильно отличаются друг от друга по характерным скоростям или временам протекающих в них процессов. Даже в пределах отдельной цепи взаимосвязанных реакций всегда существуют стадии, различающиеся по скоростям. Так, в целостной биологической системе одновременно протекают быстрые процессы ферментативного катализа (характерное время оборота фермента $\tau = 10^{-1} \div 10^{-5}$ с), физиологические процессы (характерное время — минуты) и процессы репродукции (от нескольких минут и более).

В ряде случаев в биологических системах осуществляется известный принцип узкого места, согласно которому общая скорость превращения вещества во всей цепи реакций определяется наиболее медленной стадией. Так, если отдельные стадии общего процесса обладают характерными временами $T_1, T_2, \dots, T_k, \dots, T_n$ и наиболее медленная стадия имеет время T_k такое, что $T_k \gg T_1, \dots, T_{k-1}, T_{k+1}, \dots, T_n$, то определяющим звеном будет k -е, а общее время процесса практически совпадает со значением T_k этого узкого места.

Именно наличие такой временной иерархии процессов, являющееся объективным свойством системы, позволяет существенно упростить исходную модель, по существу сведя задачу ее кинетического описания к изучению поведения наиболее медленной стадии. В этом смысле самое медленное звено — управляющее, поскольку воздействие именно на него, а не на более быстрые стадии, может повлиять на скорость протекания всего процесса. Таким образом, хотя биологические процессы и включают огромное число промежуточных стадий, динамические свойства этих систем регулируются сравнительно небольшим числом отдельных звеньев, а следовательно, их кинематическая модель может содержать и существенно меньшее число уравнений.

Практика математического моделирования показывает, что исследование таких упрощенных систем уравнений может дать более точное представление об общих динамических свойствах системы, чем решение полных моделей, особенно в тех случаях, когда не возникает необходимости

нахождения точного решения уравнений, но зато требуется предсказать характер динамического поведения системы при изменении условий ее функционирования. В биологических и химических системах такое исследование особенно важно, поскольку значения их внутренних и внешних параметров и начальные условия, как правило, варьируют и обычно не могут быть точно заданы.

Основной подход к качественной теории дифференциальных уравнений состоит в том, чтобы характеризовать состояние системы в целом значениями переменных c_1, c_2, \dots, c_n , которые они принимают в каждый момент времени в процессе изменения в соответствии с (I.1.1). Если отложить на осях прямоугольных координат в n -мерном пространстве значения переменных c_1, c_2, \dots, c_n , то состояние системы будет описываться некоей точкой M в этом пространстве с координатами $M(c_1, c_2, \dots, c_n)$. Точка M называется изображающей точкой.

Изменение состояния системы сопоставляется с перемещением изображающей точки M в n -мерном пространстве. Пространство с координатами c_1, c_2, \dots, c_n называется фазовым; кривая, описываемая в нем точкой M , — фазовой траекторией. Как будет показано в дальнейшем, изучение системы типа (I.1.1) в таком пространстве дает возможность описать качественные свойства ее поведения.

Одним из важнейших свойств открытых систем является установление в них стационарных состояний в отличие от термодинамического равновесия, свойственного изолированным системам. В связи с этим при рассмотрении общих динамических характеристик модели биологической системы в первую очередь будут изучаться свойства ее стационарных состояний. При этом будут обсуждаться следующие вопросы: существуют ли в системе стационарные состояния, сколько их, устойчивы ли они, как зависит характер устойчивости от параметров системы, как ведет себя система вблизи стационарных состояний, возможны ли между ними переходы? Методы качественной теории дифференциальных уравнений, позволяющие ответить на эти вопросы, изложены ниже.

По определению, в стационарном состоянии все производные по времени $d\bar{c}_i/dt (i=1, \dots, n)$ в левых частях системы (I.1.1) обращаются в нуль. Приравнявая к нулю правые части, получают систему алгебраических уравнений для определения стационарных значений переменных

$$\begin{aligned} \bar{c}_1, \bar{c}_2, \dots, \bar{c}_n: \\ f_1(\bar{c}_1, \bar{c}_2, \dots, \bar{c}_n) &= 0; \\ f_2(\bar{c}_1, \bar{c}_2, \dots, \bar{c}_n) &= 0; \\ f_n(\bar{c}_1, \bar{c}_2, \dots, \bar{c}_n) &= 0. \end{aligned} \quad (I.1.2)$$

Точка фазового пространства M с координатами $(\bar{c}_1, \bar{c}_2, \dots, \bar{c}_n)$ называется стационарной или особой точкой или точкой равновесия системы уравнений (не путать с состоянием термодинамического равновесия!) (см. гл. V, VI).

Динамические системы, описываемые системами обыкновенных дифференциальных уравнений типа (I.1.1), называются точечными системами. Это означает, что во всех точках такой системы значения плотности концентрации одного какого-то вещества равны в каждый момент времени. Такое описание справедливо, если усреднение концентраций по пространству, занимаемому системой, происходит гораздо быстрее, чем сами химические реакции.

Более общим является другой случай, когда значения переменных

различны в разных точках пространства, например когда одновременно с реакцией, проходящей в каком-то участке системы, реагенты диффундируют, переходя к другому участку. В этом случае скорость изменения концентраций в элементарном объеме системы будет определяться не только появлением и исчезновением в нем веществ c_1, c_2, \dots, c_n в силу реакций типа (I.1.1), но и в результате диффузионных процессов переноса вещества через границы этого элементарного объема. В такой системе скорость изменения концентрации вещества c_i в системе зависит не только от химических процессов, но и от пространственной координаты.

Кинетические уравнения, учитывающие диффузионную связь между отдельными участками пространства в системе, имеют вид

$$dc_i/dt = f(c_1, c_2, \dots, c_n) + D_{c_i} \partial^2 c_i / \partial r^2 \quad (i=1, \dots, n). \quad (I.1.3)$$

Здесь D_{c_i} — коэффициент диффузии вещества c_i , r — пространственная координата. Рассмотрение таких систем позволяет объяснить некоторые общие принципы процессов самоорганизации в живых системах, в частности распространение волн и импульсов в активных тканях, возникновение автоволновых режимов поведения биологических систем и процессов формообразования (биологический морфогенез).

При построении кинетических моделей основные переменные системы (скорость, концентрация, время реакции) для удобства анализа модели выражают обычно в безразмерных (относительных) величинах. Этот прием часто позволяет существенно уменьшить число параметров и тем самым упростить исследование. Удачное «обезразмеривание» способствует выявлению роли отдельных параметров и их сочетаний в определении характера процесса. Безразмерные дифференциальные уравнения решают, если это удается, аналитически или на ЭВМ, получая зависимости значений переменных от времени при интересующих исследователя значениях параметров. На основе кинетического исследования модели можно получить и некоторые удобные для сравнения с экспериментом косвенные характеристики: зависимость скорости реакции от внешних параметров (температура, pH), соответствующих концентраций и т. п. При необходимости переходят обратно к величинам, имеющим размерность. Этот подход использован в дальнейшем изложении.

Как пример можно рассмотреть обратимую реакцию первого порядка



Приняв $P+S=S_0$ и в начальный момент времени $t=0$ $S=S_0$, введем безразмерные концентрации $x=S/S_0$, $y=P/S_0$ и безразмерное время $\tau=k_1 t$, относительную скорость реакции $\xi=v/V$, где v — скорость реакции в произвольный момент времени, $V=k_1 S_0$ — максимальная скорость реакции в начальный момент времени, а также безразмерный параметр $\beta=k_1/k_2$, характеризующий константу равновесия реакции.

Система кинетических уравнений в безразмерном виде

$$dx/d\tau = -x(1+\beta) + \beta; \quad x+y=1; \quad x(0)=1 \quad (I.1.5)$$

имеет аналитическое решение:

$$x = \frac{1}{1+\beta} (\beta + e^{-(1+\beta)\tau}); \quad y = 1 - \frac{\beta + e^{-(1+\beta)\tau}}{1+\beta}. \quad (I.1.6)$$

Отсюда видно, что относительные стационарные концентрации \bar{x}, \bar{y} при $\tau \rightarrow \infty$ определяются только соотношением констант прямой и обратной реакций:

$$\bar{x} = \beta/(1 + \beta); \bar{y} = 1/(1 + \beta).$$

Относительные стационарные скорости прямой и обратной реакций $\xi = \beta/(1 + \beta)$ равны между собой и также определяются соотношением констант.

§ 2. Качественное исследование простейших моделей биологических процессов

Изучение качественных методов исследования, дифференциальных уравнений начинают с рассмотрения простейших математических моделей, которым соответствует одно дифференциальное уравнение первого порядка:

$$dx/dt = f(x). \quad (I.2.1)$$

Состояние систем, описываемых уравнением (I.2.1), в каждый момент времени характеризуется единственной величиной — значением переменной x в момент времени t . В первую очередь рассмотрим состояния равновесия системы, обозначив их \bar{x} (стационарная, или особая, точка). По определению, в этих точках $dx/dt|_{\bar{x}} = 0$ и, следовательно, $f(\bar{x}) = 0$. Если вывести систему из состояния равновесия, то она будет себя вести в соответствии с уравнением (I.2.1), описывающим ее поведение в области, где уже в отличие от состояния равновесия $f(x) \neq 0$.

Устойчивое состояние равновесия можно охарактеризовать следующим образом: если при достаточно малом начальном отклонении от положения равновесия система никогда не уйдет далеко от него, то состояние равновесия устойчиво и соответствует устойчивому стационарному режиму функционирования системы. Если же система после выведения из состояния равновесия будет удаляться от него в соответствии с уравнением $dx/dt = f(x)$, то это состояние равновесия является неустойчивым.

Для устойчивого состояния равновесия справедливо утверждение: если в момент времени t_0 отклонение от состояния равновесия мало ($|x(t_0) - \bar{x}| < \delta$), то в любой последующий момент времени $t > t_0$ отклонение системы от состояния равновесия будет также мало. Состояние равновесия \bar{x} устойчиво, по Ляпунову, если, задав сколь угодно малое положительное ϵ , всегда можно найти такое δ , что $|x(t) - \bar{x}| < \epsilon$ для $t_0 \leq t < +\infty$, если $|x(t_0) - \bar{x}| < \delta$.

В случае одного уравнения нетрудно, исследуя непосредственно характер функции $f(x)$ вблизи состояния равновесия $x = \bar{x}$, однозначным образом решить вопрос об устойчивости состояния равновесия. По определению, в точке $x = \bar{x}$

$$f(\bar{x}) = \left. \frac{dx}{dt} \right|_{\bar{x}} = 0$$

Здесь возможны три случая (рис. I.1).

Существует аналитический метод определения устойчивости состояния равновесия, предложенный А. А. Ляпуновым и пригодный также для исследования систем из двух уравнений и более. Суть метода состоит в следующем.

Пусть система отклонилась от точки равновесия \bar{x} и перешла в соседнюю с ней точку x . Положим $x = \bar{x} + \xi$, где ξ — малое отклонение от состояния равновесия, такое, что $\xi/\bar{x} \ll 1$. Пусть $f(x)$ — аналитическая функция. Перейдем от переменной x к переменной ξ в уравнении (I.1.1). Получим

$$d(\bar{x} + \xi)/dt = d\xi/dt = f(\bar{x} + \xi). \quad (I.2.2)$$

Стоящую в правой части этого уравнения функцию $f(\bar{x} + \xi)$ разложим в ряд Тейлора в точке \bar{x} :

$$d\xi/dt = f(\bar{x}) + f'(\bar{x})\xi + 1/2 f''(\bar{x})\xi^2 + \dots$$

Так как $f(\bar{x})=0$, то уравнение (I.2.2) примет вид

$$d\xi/dt = a_1\xi + a_2\xi^2 + a_3\xi^3 + \dots, \quad (I.2.3)$$

где $a_1 = f'(\bar{x})$, $a_2 = 1/2 f''(\bar{x})$, ...

Отбросив в уравнении (I.2.3) нелинейные члены как величины более высокого порядка малости, получим линейное уравнение $d\xi/dt = a_1\xi$, которое называется линеаризованным уравнением или уравнением первого приближения. Интеграл этого уравнения для $\xi(t)$ находится сразу: $\xi(t) = Ce^{\lambda t}$, где $\lambda = a_1 = f'(\bar{x})$, $c = \text{const}$.

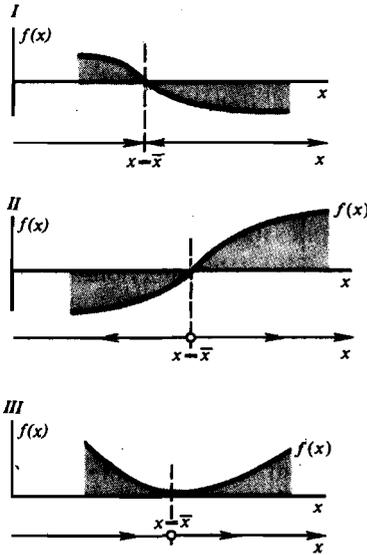


Рис. I.1.

Характер устойчивости особой точки в зависимости от знака функции $f(x)$

I. Вблизи состояния равновесия \bar{x} функция $f(x)$ меняет знак с «+» на «-» при возрастании x . Такое изменение знака $f(x)$ означает, что при $x < \bar{x}$ скорость изменения dx/dt отрицательна. При этом x увеличивается в своем стремлении к \bar{x} . При $x > \bar{x}$ $dx/dt = f(x) < 0$, т. е. x уменьшается и опять стремится к \bar{x} . Отсюда следует, что изображающая точка, находящаяся в достаточной близости от состояния равновесия $x = \bar{x}$, будет асимптотически к нему приближаться при возрастании t . Очевидно, в этом случае состояние равновесия устойчиво по критерию Ляпунова.

II. $f(x)$ меняет знак вблизи состояния равновесия $x = \bar{x}$ с «-» на «+» при возрастании x . Изображающая точка, помещенная в достаточной близости к состоянию равновесия, будет удаляться от него. В этом случае состояние равновесия неустойчиво.

III. $f(x)$ не меняет знака вблизи состояния равновесия при возрастании x . Изображающая точка, помещенная вблизи состояния равновесия с одной стороны, будет приближаться к нему, помещенная с другой — удаляться. Состояние равновесия является неустойчивым по критерию Ляпунова

Если $\lambda < 0$, то при $t \rightarrow \infty$ $\xi \rightarrow 0$ и, следовательно, первоначальное отклонение ξ от равновесия самопроизвольно затухает в силу свойств системы. Тогда стационарное состояние устойчиво по критерию Ляпунова. Наоборот, если $\lambda > 0$, то при $t \rightarrow \infty$ $\xi \rightarrow \infty$ и состояние равновесия неустойчиво. Если же $\lambda = 0$, то уравнение первого приближения, вообще говоря, не может дать ответа на вопрос об устойчивости исходной системы.

Рассмотрим пример — упрощенную модель культиватора, в котором одновременно происходят как размножение бактериальных клеток и их гибель, так и приток клеток извне с постоянной скоростью. Пусть скорость гибели клеток пропорциональна их концентрации, а скорость размножения — квадрату концентрации клеток (это означает, что скорость размножения пропорциональна вероятности встречи двух клеток разного пола). Дифференциальное уравнение, описывающее изменение концентрации клеток c в такой системе, имеет вид

$$dc/dt = \alpha - bc + \gamma c^2 = f(c, \alpha). \quad (I.2.4)$$

Здесь α — скорость притока; γ, b — коэффициенты размножения и гибели клеток соответственно. Для простоты положим $\gamma = 1$. Рассмотрим характеристики стационарных состояний такой системы в зависимости от значения скорости

притока α . Стационарные значения клеточных концентраций найдем из уравнения $f(\bar{c}, \alpha) = 0$. Их два:

$$\bar{c}_1 = b/2 + \sqrt{\frac{b^2}{4} - \alpha}; \quad \bar{c}_2 = b/2 - \sqrt{\frac{b^2}{4} - \alpha}.$$

По смыслу стационарные концентрации \bar{c}_1, \bar{c}_2 должны быть действительными числами, отсюда видно, что при $\alpha > b^2/4$ в системе не может быть достигнуто стационарное состояние. При $\alpha = b^2/4$ существует лишь одно стационарное состояние: $\bar{c}_1 = \bar{c}_2 = b/2$, а при $\alpha < b^2/4$ — два стационарных режима:

$$\bar{c}_{1,2} = b/2 \pm \sqrt{b^2/4 - \alpha}.$$

Это соответствует двум ветвям стационарных состояний на графике, по оси абсцисс которого отложены значения скорости притока α (рис. 1.2). Производная правой части (1.2.4) для ветви $c_1(\alpha)$ равна

$$f'_c(\bar{c}_1, \alpha) = 2\sqrt{b^2/4 - \alpha} > 0,$$

а для ветви $\bar{c}_2(\alpha)$ равна

$$f'_c(\bar{c}_2, \alpha) = -2\sqrt{b^2/4 - \alpha} < 0.$$

Согласно критерию Ляпунова, отсюда следует, что все значения $c_1(\alpha)$ являются неустойчивыми, а $c_2(\alpha)$ — устойчивыми стационарными концентрациями.

Итак, при $\alpha > b^2/4$ положительных стационарных решений нет, при $\alpha = b^2/4$ существует одно стационарное состояние $c = b/2$ на границе устойчивости, наконец, при $\alpha < b^2/4$ в системе имеется два стационарных состояния, причем одно из них устойчивое, другое — неустойчивое.

Вообще говоря, в любой системе вида

$$dx/dt = f(x, \alpha), \tag{1.2.5}$$

где α — параметр, при изменении α интегральные кривые будут так или иначе меняться. Однако при непрерывном изменении α общий вид кривых будет претерпевать лишь количественные изменения. Только при некоторых особых, бифуркационных, значениях α имеют место качественные изменения характера интегральных кривых, т. е. изменение числа особых точек и характера их устойчивости. Именно таким бифуркационным значением параметра и является $\alpha = b^2/4$. Прочие значения α называются обыкновенными.

График, построенный в координатах (α, x) для уравнения (1.2.5), называется бифуркационной диаграммой. Такая диаграмма наглядно иллюстрирует зависимость положений равновесия системы от параметра α . Характер устойчивости стационарной точки можно выяснить, определив в этой точке знак производно: $f'_x(\bar{x}, \alpha)$

Стационарные значения $x = \bar{x}$ находят из уравнения $f(\bar{x}, \alpha) = 0$. В зависимости от вида функции $f(x, \alpha)$ это уравнение может иметь один или несколько корней при одном и том же значении параметра α . Так, если $f(x, \alpha)$ — полином x степени больше единицы, кривая $x = \bar{x}(\alpha)$ примет такой вид, что некоторым значениям α будет соответствовать несколько стационарных состояний x (рис. 1.3).

Характер движения в системе подробно исследован в § 4 гл. II.

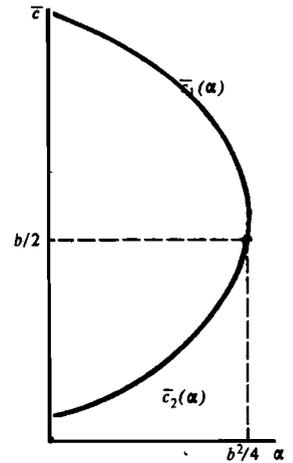


Рис. 1. 2. Зависимость стационарной концентрации клеток c от параметра α для уравнения (1.2.4).

Ветви стационарных состояний $c_1(\alpha)$ и $c_2(\alpha)$ отличаются друг от друга по характеру устойчивости

Описанная выше бифуркационная ситуация называется складкой в терминах теории «катастроф», где под катастрофами понимаются резкие изменения динамического типа поведения системы. Складка (рис. 1.3) содержит две катастрофы: при $\alpha = \alpha'$ происходит перескок системы с нижней ветви на верхнюю, а при $\alpha = \alpha''$ — с верхней на нижнюю. Обе катастрофы связаны со взаимной аннигиляцией устойчивой и неустойчивой ветвей решения. В теории катастроф строго доказывается, что складка является единственным типом такого рода катастроф в однопараметрических системах. В системах, содержащих два параметра, возможны два

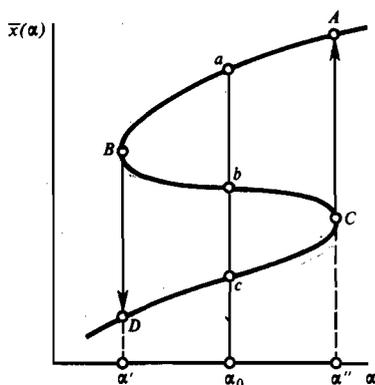


Рис. 1.3.
Зависимость правой части уравнения (1.2.4) от параметра α

При $\alpha = \alpha_0$ существует три различных стационарных режима: a, b, c . Найдя знак производной $f'_x(x, \alpha)$ для каждой из точек a, b, c , можно определить, какие из них соответствуют устойчивым стационарным состоянием: $f'_x(x_a, \alpha) < 0$; $f'_x(x_b, \alpha) > 0$; $f'_x(x_c, \alpha) < 0$. Это означает, что a, c — устойчивые, b — неустойчивое состояния. Дуги кривой AB и DC представляют собой ветви устойчивых, а BC — ветвь неустойчивых стационарных состояний. Бифуркационные значения параметра α , при которых изменяется число стационарных состояний с одновременным изменением типа устойчивости, обозначены α' и α'' .

типа катастроф: складка и сборка (рис. 1.4). В системах с большим числом параметров возможны катастрофы более сложного вида. Катастрофы типа складки часто встречаются в моделях биологических систем. Примером могут служить рассмотренные ниже (см. § 3 гл. III) S-образные параметрические зависимости стационарной концентрации субстрата от параметра в ферментативных реакциях с субстратным угнетением и обратной реакцией притока субстрата.

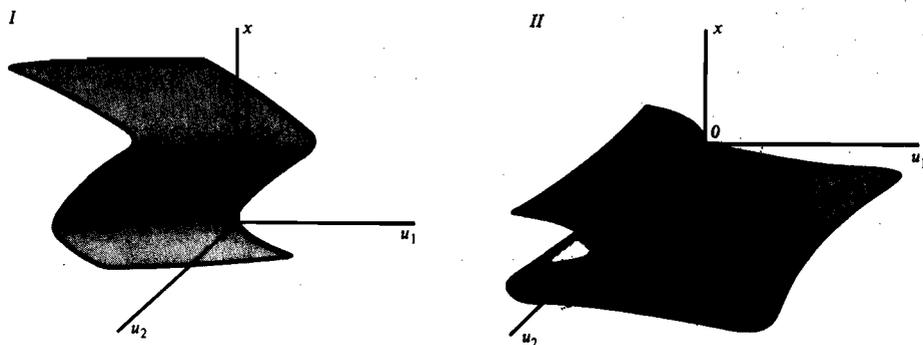


Рис. 1.4.
«Катастрофы» типа «складка» (I) и «сборка» (II) в трехмерном пространстве

§ 3. Качественные методы исследования систем дифференциальных уравнений

В настоящем параграфе рассматриваются модели биологических систем, состоящие из двух дифференциальных уравнений. При их изучении будут применены некоторые математические понятия и методы, являющиеся основой теории качественного изучения динамических свойств биологических процессов. Универсальность этих методов обусловлена тем обстоятельством, что динамика взаимодействий компонентов различных биологических систем часто может быть описана математически сходными выражениями. Разительным примером такого изоморфизма формальных законов (но не механизмов!) взаимодействия компонентов систем различной биологической природы являются уравнения, описывающие взаимодействия видов в биоценозах, и уравнения, описывающие взаимодействия химических веществ в растворах.

Простейшие модели этих двух систем впервые были предложены независимо А. Д. Лоткой в 1926 г. (модель химической реакции) и В. Вольтерра в 1931 г. (модель хищник — жертва).

Пусть имеется химическая реакция, протекающая по общей схеме



которая означает следующее. В некотором объеме находится в избытке вещество A . Молекулы A с некоторой постоянной скоростью k_0 превращаются в молекулы вещества X (реакция нулевого порядка). Вещество X может превращаться в вещество Y по реакции второго порядка, т. е. скорость этой реакции тем больше, чем больше концентрации веществ X и Y . Молекулы Y , в свою очередь, необратимо распадаются, в результате образуется вещество B (реакция первого порядка).

$$dx/dt = k_0 - k_1xy; \quad dy/dt = k_1xy - k_2y; \quad db/dt = k_2y.$$

Здесь x, y, b — концентрации химических компонентов; $k_0 = k_0A$, k_1, k_2 — константы скоростей реакций. Первые два уравнения этой системы не зависят от b , поэтому их можно рассматривать отдельно:

$$dx/dt = k_0 - k_1xy; \quad dy/dt = k_1xy - k_2y. \quad (I.3.2)$$

Теперь рассмотрим экологическую модель Вольтерра. Пусть в некотором замкнутом районе живут жертвы и хищники, например зайцы и волки. Зайцы питаются растительной пищей, всегда имеющейся в достаточном количестве. Волки (хищники) могут питаться лишь зайцами (жертвами). Обозначим число зайцев x , а число волков — y . Так как количество пищи для зайцев не ограничено, мы можем предположить, что зайцы размножаются со скоростью, пропорциональной их числу:

$$\dot{x}_{\text{разм}} = \varepsilon_1 x. \quad (I.3.3)$$

(Уравнение (I.3.3) соответствует уравнению автокаталитической химической реакции первого порядка.)

Пусть убыль численности зайцев пропорциональна вероятности встречи их с волками, т. е. пропорциональна произведению $x \times y$. Количество волков также нарастает тем быстрее, чем чаще их встречи с зайцами, т. е. пропорционально $x \times y$. В химической кинетике это соответствует бимолекулярной реакции, когда вероятность появления новой молекулы пропорциональна вероятности встречи двух молекул, т. е. произведению их концентраций. Кроме того, имеет место естественная смертность волков, причем скорость убывания численности особей пропорциональна их коли-

честву. Это соответствует процессу оттока химического вещества из сферы реакции. В итоге для изменений численности зайцев x и волков y получим следующую систему уравнений:

$$dx/dt = x(\varepsilon_1 - \gamma_1 y); \quad dy/dt = -y(\varepsilon_2 - \gamma_2 x). \quad (I.3.4)$$

Видно сходство систем уравнений (I.3.2) и (I.3.4). Более того, если член нулевого порядка k_0 в первом уравнении системы (I.3.2) заменить на автокаталитический член $k_0 x$, то системы уравнений (I.3.2) и (I.3.4) будут тождественны.

Качественные методы исследования подобных систем рассмотрим на моделях, представимых в виде систем двух автономных дифференциальных уравнений (правые части не зависят явно от времени), которые могут быть записаны в общем виде:

$$dx/dt = P(x, y); \quad dy/dt = Q(x, y). \quad (I.3.5)$$

Здесь $P(x, y)$, $Q(x, y)$ — непрерывные функции, определенные в некоторой области евклидовой плоскости (x, y — декартовы координаты) и имеющие в этой области непрерывные производные порядка не ниже первого.

Область может быть как неограниченной, так и ограниченной. В том случае, когда переменные величины x, y имеют конкретный биологический смысл (концентрации веществ, численность вида), на них, как правило, накладываются некоторые ограничения. Прежде всего биологические переменные не могут быть отрицательными. Так, в модели Вольтерра, описанной выше, x — переменная, характеризующая численность жертвы, а y — хищника. Область G представляет собой положительный квадрант правой полуплоскости:

$$x \geq 0; \quad y \geq 0.$$

В процессе изменения состояния системы во времени переменные x, y изменяются согласно системе уравнений (I.3.5) так, что каждому состоянию системы соответствует пара значений (x, y), а каждая пара значений (x, y) описывает определенное состояние системы. Рассмотрим плоскость с осями координат, на которых отложены значения переменных x, y . Каждая точка M этой плоскости с координатами (x, y) соответствует определенному состоянию системы. Такая плоскость носит название фазовой плоскости или плоскости состояний. Она представляет совокупность всех возможных состояний системы. Точка $M(x, y)$ называется изображающей или представляющей. Пусть при $t = t_0$ координаты изображающей точки $M_0(x_0, y_0)$. В каждый следующий момент времени t изображающая точка будет двигаться в соответствии с системой уравнений (I.3.5) и принимать положение $M(x, y)$, соответствующее значениям $x(t)$, $y(t)$. Совокупность этих точек на фазовой плоскости x, y называется фазовой траекторией.

Характер фазовых траекторий отражает общие качественные черты поведения системы во времени. Фазовая плоскость, разбитая на траектории, дает легкообозримый «портрет» системы. Она позволяет сразу охватить всю совокупность возможных движений (изменения переменных x, y), отвечающих различным начальным условиям. Фазовая траектория имеет касательные, тангенс угла наклона которых в каждой точке $M(x, y)$ равен значению производной в этой точке $dy(x, y)/dt$. Следовательно, чтобы провести фазовую траекторию через точку фазовой плоскости $M_1(x_1, y_1)$, достаточно знать направление касательной в этой точке плоскости или значение производной

$$\left. \frac{dy}{dx} \right|_{\substack{x=x_1 \\ y=y_1}}$$

Для этого необходимо получить уравнение, содержащее переменные x , y и не содержащее времени t в явном виде. С этой целью разделим второе уравнение системы (1.3.5) на первое. Получим дифференциальное уравнение

$$\frac{dy}{dx} = \frac{Q(x,y)}{P(x,y)}; \quad (1.3.6)$$

во многих случаях более простое, чем исходная система (1.3.5). Решение уравнения (1.3.6) $y = y(x, c)$ или в неявной форме $F(x, y) = C$, где C — постоянная интегрирования, дает семейство интегральных кривых — фазовых траекторий системы (1.3.5) на плоскости x, y .

Однако в общем случае уравнение (1.3.6) может не иметь аналитического решения, и тогда построение интегральных кривых приходится производить качественными методами.

Метод изоклин. Для качественного построения фазового портрета системы обычно используют метод изоклин. При этом на фазовой плоскости наносят линии, которые пересекают интегральные кривые под одним определенным углом. Рассматривая ряд изоклин, можно установить, каков будет ход самих интегральных кривых.

Уравнение изоклин легко получить из уравнения (1.3.6). Положим, $dy/dx = A$, где A — определенная постоянная величина. Значение A представляет собой тангенс угла наклона касательной к фазовой траектории и, следовательно, может принимать значения от $-\infty$ до $+\infty$. Подставляя в (1.3.6) вместо dy/dx величину A , получаем уравнение изоклин:

$$A = \frac{Q(x,y)}{P(x,y)}. \quad (1.3.7)$$

Давая A определенные числовые значения, получаем семейство кривых. В любой точке каждой из этих кривых угол наклона касательной к фазовой траектории, проходящей через эту точку, равен одной и той же величине, а именно величине A , характеризующей данную изоклину.

Отметим, что в случае линейных систем, т. е. систем вида

$$dx/dt = ax + by; \quad dy/dt = cx + dy, \quad (1.3.8)$$

изоклины представляют собой пучок прямых, проходящих через начало координат:

$$\frac{cx + dy}{ax + by} = A \text{ или } y = \frac{(Aa - c)x}{d - Ab}.$$

Особые точки. Уравнение (1.3.6) непосредственно определяет в каждой точке плоскости единственную касательную к соответствующей интегральной кривой. Исключение составляет точка пересечения всех изоклин (\bar{x}, \bar{y}) , в которой направление касательной становится неопределенным в силу неопределенности в этом случае значения производной:

$$\left. \frac{dy}{dx} \right|_{\substack{x=\bar{x} \\ y=\bar{y}}} = \frac{Q(\bar{x}, \bar{y})}{P(\bar{x}, \bar{y})} = \frac{0}{0}.$$

Точки, в которых одновременно обращаются в нуль производные по времени переменных x и y

$$\left. \frac{dx}{dt} \right|_{\bar{x}, \bar{y}} = P(\bar{x}, \bar{y}) = 0; \quad (1.3.9)$$

$$\left. \frac{dy}{dt} \right|_{\bar{x}, \bar{y}} = Q(\bar{x}, \bar{y}) = 0.$$

и в которых направление касательных к интегральным кривым неопределенно, называются особыми точками. Особая точка уравнения фазовых траекторий (I.3.6) соответствует стационарному состоянию системы (I.3.5), так как скорости изменения переменных в этой точке равны нулю, а ее координаты суть стационарные значения переменных x , y .

Для качественного изучения системы часто можно ограничиться построением лишь некоторых изоклин на фазовой плоскости. Особый интерес представляют так называемые главные изоклины: $dy/dx=0$ — изоклина горизонтальных касательных к фазовым траекториям, уравнение которой $Q(x,y)=0$, и изоклина вертикальных касательных $dy/dx=\infty$, которой соответствует уравнение $P(x,y)=0$.

Построив главные изоклины и найдя точку их пересечения, координаты которой удовлетворяют условиям

$$P(\bar{x},\bar{y})=0; Q(\bar{x},\bar{y})=0, \quad (I.3.10)$$

определяют тем самым точку пересечения всех изоклин фазовой плоскости. Эта точка является, как уже говорилось, особой точкой и соответствует стационарному состоянию системы.

Система уравнений (I.3.5) обладает столькими стационарными состояниями, сколько точек пересечения главных изоклин имеется на фазовой плоскости.

Устойчивость стационарного состояния. Пусть рассматриваемая система находится в состоянии равновесия. Тогда изображающая точка на фазовой плоскости находится в неподвижности в одной из особых точек уравнения интегральных кривых (I.3.6), так как в этих точках, по определению, $dx/dt=0$; $dy/dt=0$.

Если теперь вывести систему из состояния равновесия, то изображающая точка сместится из особой точки и начнет двигаться по фазовой плоскости в соответствии с уравнениями ее движения (I.3.5). Устойчива ли рассматриваемая особая точка, определяет соответственно то, уйдет или нет изображающая точка из некоторой данной области, окружающей особую точку (эта область может быть большей или меньшей в зависимости от условий задачи); (рис. I.5).

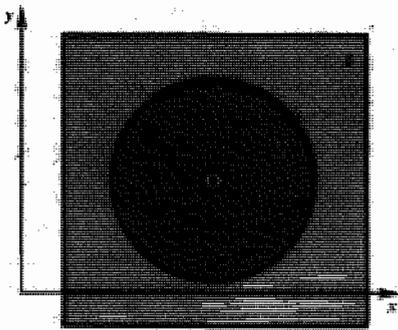


Рис. I.5.
Иллюстрация к определению устойчивости

Состояние равновесия является устойчивым (по критерию Ляпунова), если для любой заданной области допустимых отклонений от состояния равновесия (область ϵ) можно указать область $\delta(\epsilon)$, окружающую состояние равновесия и обладающую тем свойством, что ни одно движение изображающей точки, начинающееся внутри δ , никогда не достигнет границы области ϵ . Наоборот, состояние равновесия неустойчиво, если может быть указана такая область отклонений от состояния равновесия ϵ , для которой не существует области δ , окружающей состояние равновесия и обладающей тем свойством, что ни одно движение, начинающееся внутри δ , никогда не достигнет границы ϵ .

В действительности в природе реализуются стационарные состояния, которые обязательно являются устойчивыми. Поэтому устойчивость стационарного состояния системы уравнений, представляющей собой математическую модель реальной системы, — один из основных критериев ее адекватности моделируемому объекту. В практике моделирования биологических процессов

используют аналитический метод исследования устойчивости стационарного состояния Пуанкаре и Ляпунова, который будет изложен в упрощенной форме. Строгое математическое обоснование этого метода дано в специальной литературе.

Исследование устойчивости состояния равновесия (точка пересечения главных изоклин $P(x, y)=0$; $Q(x, y)=0$) связано с рассмотрением характера движений изображающей точки при отклонении от состояния равновесия. Для удобства выкладок введем вместо переменных x, y новые переменные ξ, η , определив их как смещения относительно положения равновесия на фазовой плоскости: $x = \bar{x} + \xi$; $y = \bar{y} + \eta$. (I.3.11)

Подставив эти выражения в (I.3.5), получим

$$\begin{aligned} d\bar{x}/dt + d\xi/dt &= P(\bar{x} + \xi, \bar{y} + \eta); \\ d\bar{y}/dt + d\eta/dt &= Q(\bar{x} + \xi, \bar{y} + \eta), \end{aligned} \quad (I.3.12)$$

$d\bar{x}/dt = d\bar{y}/dt = 0$, так как \bar{x}, \bar{y} — координаты особой точки.

Как и в случае одного уравнения, разложим правые части полученных уравнений в ряд Тейлора по переменным ξ, η и отбросим нелинейные члены. Получим систему линейных уравнений:

$$d\xi/dt = a\xi + b\eta; \quad d\eta/dt = c\xi + d\eta, \quad (I.3.13)$$

где коэффициенты a, b, c, d суть значения частных производных в точке (\bar{x}, \bar{y}) :

$$a = P'_x(\bar{x}, \bar{y}); \quad b = P'_y(\bar{x}, \bar{y}); \quad c = Q'_x(\bar{x}, \bar{y}); \quad d = Q'_y(\bar{x}, \bar{y}).$$

Система (I.3.13) называется линеаризованной или системой первого приближения.

Для широкого класса систем, а именно «грубых» систем, характер фазовых траекторий в окрестности особых точек сохраняется при любых достаточно малых изменениях правых частей уравнений (I.3.5) — функций P и Q , если малыми являются также изменения производных этих функций. Для таких систем исследование уравнений первого приближения (I.3.13) дает правильный ответ на вопрос об устойчивости состояния равновесия системы (I.3.5) и о топологической структуре фазовой плоскости в окрестности этого состояния равновесия.

Система (I.3.13) линейная, а потому допускает аналитическое решение. Общее решение системы находят следующим образом:

$$\xi = Ae^{\lambda t}; \quad \eta = Be^{\lambda t}. \quad (I.3.14)$$

Подставив эти выражения в (I.3.13) и сократив полученные выражения на $e^{\lambda t}$, получим

$$\lambda A = aA + bB; \quad \lambda B = cA + dB. \quad (I.3.15)$$

Алгебраическая система уравнений (I.3.15) с неизвестными A, B имеет, как известно, ненулевое решение лишь в том случае, если ее определитель, составленный из коэффициентов при неизвестных, равен нулю:

$$\begin{vmatrix} a - \lambda & b \\ c & d - \lambda \end{vmatrix} = 0$$

Раскрыв этот определитель, получим так называемое характеристическое уравнение системы:

$$\lambda^2 - (a + d)\lambda + (ad - bc) = 0. \quad (I.3.16)$$

Решение этого уравнения дает значения показателя $\lambda_{1,2}$, при которых возможны ненулевые для A и B решения системы (I.3.15):

$$\lambda_{1,2} = \frac{a+d}{2} \pm \sqrt{\frac{(a+d)^2}{4} + bc - ad}. \quad (I.3.17)$$

Если подкоренное выражение отрицательно, $\lambda_{1,2}$ — комплексно-сопряженные числа. Предположим, что оба корня уравнения (I.3.16) имеют отличные от нуля действительные части и что нет кратных корней. Тогда общее решение системы (I.3.13), записанное в виде (I.3.14), можно представить линейной комбинацией экспонент с показателями λ_1 и λ_2 :

$$\xi = C_{11}e^{\lambda_1 t} + C_{12}e^{\lambda_2 t}; \quad \eta = C_{21}e^{\lambda_1 t} + C_{22}e^{\lambda_2 t}. \quad (I.3.18)$$

Поведение переменных ξ , η , соответствующее (I.3.18), и, следовательно, поведение переменных x , y в окрестности особой точки (x, y) зависят от вида показателей экспонент λ_1 , λ_2 . В том случае, когда показатели λ_1 , λ_2 действительны и одного знака, особая точка носит название узла (рис. I.6).

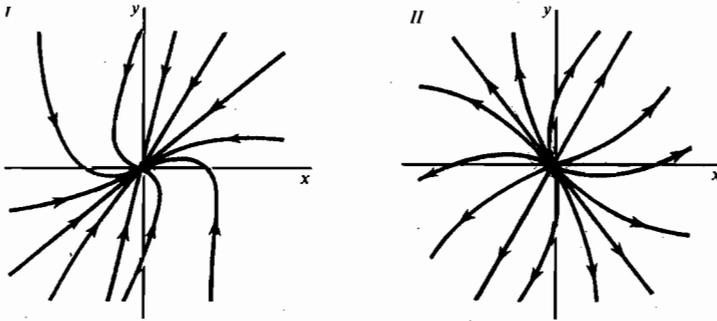


Рис. I.6. Устойчивый (I) и неустойчивый (II) узлы на фазовой плоскости

Если $\lambda_{1,2} < 0$, значения переменных ξ , η (отклонения от положения равновесия) со временем уменьшаются. Особая точка (x, y) в этом случае представляет собой устойчивый узел (I). В том случае, когда $\lambda_{1,2} > 0$, значения ξ , η со временем увеличиваются, особая точка является неустойчивым узлом (II)

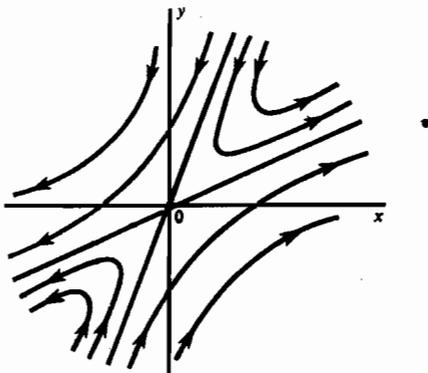


Рис. I.7. Особая точка типа «седло» на фазовой плоскости x, y

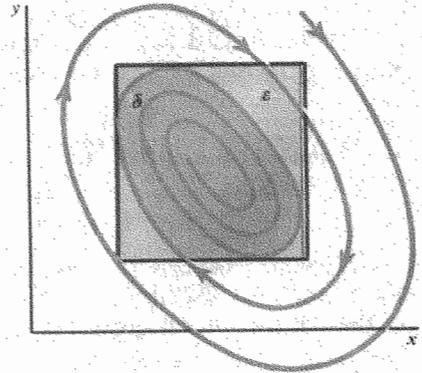


Рис. I.8. Особая точка типа «фокус» на фазовой плоскости x, y

Для многих биологических систем характерен «бесколебательный» переход от произвольного начального в стационарное состояние, которому в модели соответствует стационарное решение типа устойчивый узел.

В том случае, когда корни $\lambda_{1,2}$ действительны, но разных знаков, поведение переменных изображается на фазовой плоскости кривыми гиперболического типа (рис. 1.7). Такая особая точка является неустойчивой и называется особой точкой типа «седло». Легко видеть, что, где бы ни находилась изображающая точка в начальный момент (за исключением особой точки и сепаратрисы, обозначенной на рисунке пунктиром), она всегда в конечном счете будет удаляться от равновесия.

Особые точки типа седла играют важную роль в так называемых «триггерных» биологических системах (подробнее см. § 1 гл. II).

В том случае, когда λ_1, λ_2 комплексно-сопряжены, изменение переменных x, y во времени носит колебательный характер, а фазовые траектории представляют собой спирали (рис. 1.8). Особая точка в этом случае называется фокусом. При этом, если действительные части $\lambda_{1,2}$ отрицательные ($\text{Re}\lambda_{1,2} < 0$), колебания затухают и положение равновесия является устойчивым фокусом, если же $\text{Re}\lambda_{1,2} > 0$, амплитуда колебаний со временем нарастает, а особая точка является неустойчивым фокусом.

В том случае, когда $\text{Re}\lambda = 0$, фазовые траектории в окрестности особой точки представляют собой эллипсы (рис. 1.9). Через особую точку в этом случае не проходит ни одна интегральная кривая. Такая изолированная особая точка, вблизи которой интегральные кривые представляют собой замкнутые кривые, в частности эллипсы, «вложенные друг в друга» и охватывающие особую точку, называется центром. Классическим примером системы, имеющей своей особой точкой центр, является приведенная выше система уравнений Вольтерра, описывающая взаимодействие популяций хищника и жертвы (1.3.4).

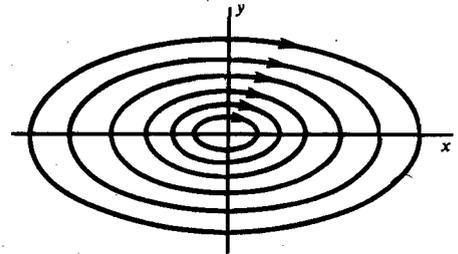


Рис. 1.9. Особая точка типа «центр» на фазовой плоскости xy

Сформулируем введенную классификацию особых точек линейной системы (1.3.13). В случае отсутствия вырождения ($ad - bc \neq 0$) возможны шесть типов состояний равновесия в зависимости от характера корней характеристического уравнения (1.3.16):

- 1) устойчивый узел (λ_1 и λ_2 действительны и отрицательны);
- 2) неустойчивый узел (λ_1 и λ_2 действительны и положительны);
- 3) седло (λ_1 и λ_2 действительны и разных знаков);
- 4) устойчивый фокус (λ_1 и λ_2 комплексны и $\text{Re}\lambda < 0$);
- 5) неустойчивый фокус (λ_1 и λ_2 комплексны и $\text{Re}\lambda > 0$);
- 6) центр (λ_1 и λ_2 — мнимые).

Первые пять типов состояния равновесия являются грубыми: их характер не изменяется при достаточно малых изменениях правых частей уравнений (1.3.5) и их производных первого порядка.

Анализ модели химической реакции (1.3.2). Применим введенные выше представления для исследования химической реакции, модель которой описывается системой уравнений (1.3.2):

$$dx/dt = k_0 - k_1xy; \quad dy/dt = k_1xy - k_2y.$$

В стационарном состоянии $dx/dt = 0$; $dy/dt = 0$. Эти условия дают систему алгебраических уравнений, связывающих равновесные концентрации x и y :

$$k_0 - k_1 \bar{x} \bar{y} = 0; k_1 \bar{x} \bar{y} - k_2 \bar{y} = 0.$$

Координаты особой точки: $\bar{x} = k_2/k_1$; $\bar{y} = k_0/k_2$.

Исследуем устойчивость этого стационарного состояния методом Ляпунова. Введем новые переменные ξ, η , характеризующие отклонения переменных x, y от положения равновесия \bar{x}, \bar{y} :

$$x(t) = \bar{x} + \xi(t); y(t) = \bar{y} + \eta(t).$$

Линеаризованная система (частный случай системы (I.3.13) в новых переменных) имеет вид

$$\frac{d\xi}{dt} = -k_2 \eta - \frac{k_1 k_0}{k_2} \xi; \quad \frac{d\eta}{dt} = \frac{k_0 k_1}{k_2} \xi. \tag{I.3.19}$$

Величины ξ, η могут менять знак, в то время как исходные переменные x, y , характеризующие концентрации, могут быть только положительными. Характеристическое уравнение системы (I.3.18)

$$\begin{vmatrix} -\frac{k_1 k_0}{k_2} - \lambda & -k_2 \\ \frac{k_0 k_1}{k_2} & -\lambda \end{vmatrix} = 0,$$

или

$$\lambda^2 + \lambda \frac{k_1 k_0}{k_2} + k_0 k_1 = 0.$$

Корни характеристического уравнения

$$\lambda_{1,2} = \frac{1}{2} \left(-\frac{k_1 k_0}{k_2} \pm \sqrt{\left(\frac{k_1 k_0}{k_2}\right)^2 - 4k_0 k_1} \right).$$

При $4k_2^2 > k_0 k_1$ подкоренное выражение отрицательно и особая точка — фокус, при обратном соотношении — узел. И в том и в другом случае особая точка устойчива, так как действительная часть обоих корней характеристического уравнения отрицательна.

Таким образом, в рассматриваемой химической реакции возможны разные изменения переменных в зависимости от соотношения значений констант скоростей: при $4k_2^2 > k_0 k_1$ — затухающие колебания концентраций переносчиков; при $4k_2^2 < k_0 k_1$ — монотонное бесколебательное приближение концентраций к стационарным. Соотношение параметров, при котором $4k_2^2 = k_0 k_1$, соответствует бифуркации, т. е. изменению типа особой точки системы уравнений (I.3.2).

Из системы уравнений (I.3.1) видно, что установление стационарных концентраций x, y в системе химических реакций Лотки приводит к установлению постоянной скорости прироста концентрации вещества B : $db/dt = k_2 y$. При $t \rightarrow \infty$ концентрация вещества B будет неограниченно расти, что в реальной системе реализоваться не может. Однако исследованная система может являться фрагментом более сложной химической системы, например, в том случае, когда приток вещества X осуществляется из большого резервуара, а отток веществ Y — в большой резервуар емкости B . При этих предположениях в промежутках времени, малых по сравнению с временем заполнения емкостей, описанное рассмотрение является правомерным.

Анализ модели хищник — жертва (I.3.4). Исследуем особую точку вольтерровской модели хищник — жертва (I.3.4). Ее координаты легко найти, приравняв правые части уравнений системы (I.3.4) нулю. Это дает стационарные ненулевые значения: $x = \varepsilon_2/\gamma_1$; $y = \varepsilon_1/\gamma_2$. Так как все параметры

$\varepsilon_1, \varepsilon_2, \gamma_1, \gamma_2$ положительны, точка $(\bar{x}; \bar{y})$ расположена в положительном квадранте фазовой плоскости. Линеаризация системы вблизи этой точки дает

$$\frac{d\xi}{dt} = -\gamma_2 \bar{x} \eta = -\frac{\gamma_2 \varepsilon_2}{\gamma_1} \eta; \quad \frac{d\eta}{dt} = \gamma_1 \bar{y} \xi = \frac{\gamma_1 \varepsilon_1}{\gamma_2} \xi.$$

Здесь $\xi(t), \eta(t)$ — отклонения от особой точки на фазовой плоскости:

$$\begin{aligned} \xi(t) &= x(t) - \bar{x}; \\ \eta(t) &= y(t) - \bar{y}. \end{aligned}$$

Характеристическое уравнение системы

$$\begin{vmatrix} -\lambda & -\frac{\gamma_2 \varepsilon_2}{\gamma_1} \\ \frac{\gamma_1 \varepsilon_1}{\gamma_2} & -\lambda \end{vmatrix} = 0; \quad \lambda^2 + \varepsilon_1 + \varepsilon_2 = 0.$$

Корни этого уравнения чисто мнимые: $\lambda_{1,2} = \pm i\sqrt{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}$.

Как уже было показано, в этом случае фазовые траектории вблизи особой точки представляют собой concentric эллипсы, а сама особая точка является центром (рис. 1.10). Вдали от особой точки фазовые траектории также являются замкнутыми, хотя их форма и отличается от эллипсоидальной.

Особая точка типа «центр» является в целом неустойчивой особой точкой. Действительно, пусть колебания $x(t)$ и $y(t)$ происходят таким образом, что изображающая точка движется на фазовой траектории 1 (рис. 1.10). В момент времени, когда точка находится в положении M , в систему извне добавляют некоторое число особей Δy такое, что изображающая точка переходит скачком из точки M в точку M' . После этого, если система снова предоставлена самой себе, колебания $x(t), y(t)$ уже будут происходить с большими амплитудами, чем прежде, и изображающая точка будет двигаться по траектории 2. Таким образом, колебания в системе неустойчивы — они навсегда изменяют свои характеристики при внешнем воздействии.

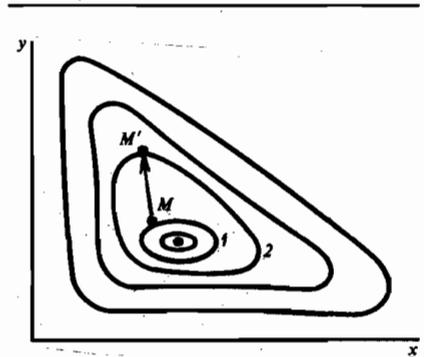


Рис. 1.10. Фазовый портрет системы хищник — жертва (особая точка типа «центр»)

На рис. 1.11 приведены графики функций $x(t), y(t)$. Видно, что $x(t)$ и $y(t)$ являются периодическими функциями времени, причем максимум численности жертв всегда опережает максимум численности хищников.

На рис. 1.12 изображены кривые численности североамериканского зайца и рыси в Канаде, построенные на основании данных о числе заготовленных шкур. Форма реальных кривых гораздо менее правильная, чем теоретических. Однако модель обеспечивает совпадение наиболее существенных характеристик этих кривых — величин амплитуды и сдвига фаз между колебаниями численностей хищников и жертв.

Гораздо более серьезным недостатком модели Вольтерра является неустойчивость решений системы уравнений, когда любое случайное изменение численности одного из видов приводит к изменению амплитуды колебаний обоих видов. Естественно, что в природных условиях животные подвергаются

огромному количеству таких случайных воздействий. Однако, как видно из рис. I.12, амплитуда колебаний численности видов мало изменяется от года к году.

В силу негрубости системы Вольтерра произвольно малое изменение вида правых частей уравнений системы (I.3.4) приводит к изменению типа особой точки и, следовательно, характера фазовых траекторий системы.

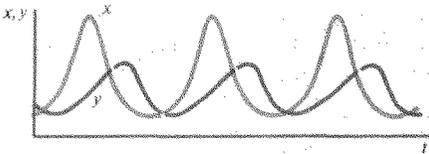


Рис. I.11.
Зависимость численности хищника y и жертвы x от времени

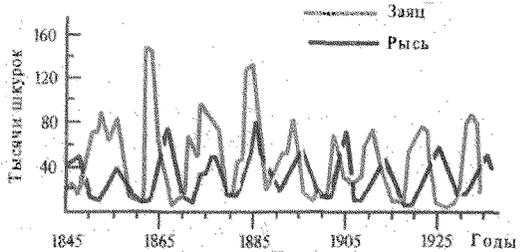


Рис. I.12.
Кривые численности зайца и рыси в Канаде (по К. Вилли, В. Детье, 1974)

Периоды колебаний численности зайцев (жертвы) и рысей (хищники) примерно одинаковы и составляют 9–10 лет. При этом максимум численности зайцев опережает, как правило, максимум численности рысей на один год

С целью устранения этого недостатка были предложены различные модификации системы (I.3.4). Рассмотрим модель, учитывающую самоограничения в росте обеих популяций, где видно, как может меняться характер решений при изменении параметров системы:

$$\begin{aligned} dx/dt &= x(\epsilon_1 - \gamma_{12}y - \gamma_{11}x); \\ dy/dt &= y(-\epsilon_2 + \gamma_{21}x - \gamma_{22}y). \end{aligned} \quad (I.3.20)$$

Система (I.3.20) отличается от ранее рассмотренной системы (I.3.4) наличием в правых частях уравнений членов $-\gamma_{11}x$, $-\gamma_{22}y$, которые отражают тот факт, что численность популяции жертв не может расти до бесконечности даже в отсутствие хищников вследствие ограниченности пищевых ресурсов. Такие же самоограничения накладываются и на популяцию хищников (рис. I.13).

Для нахождения стационарных численностей видов \bar{x} и \bar{y} приравняем нулю правые части уравнений системы (I.3.20). Решения с нулевыми значениями численностей жертв или хищников не будут нас интересовать. Рассмотрим систему алгебраических уравнений:

$$\gamma_{11}\bar{x} + \gamma_{12}\bar{y} = \epsilon_1; \quad \gamma_{12}\bar{x} - \gamma_{22}\bar{y} = \epsilon_2.$$

Координаты особой точки даются выражениями

$$\bar{x} = \frac{\epsilon_1\gamma_{11} - \epsilon_2\gamma_{12}}{-\gamma_{11}\gamma_{22} + \gamma_{12}^2}; \quad \bar{y} = \frac{\epsilon_1\gamma_{11} - \epsilon_2\gamma_{12}}{\gamma_{12}^2 - \gamma_{11}\gamma_{22}}. \quad (I.3.21)$$

Корни характеристического уравнения системы (I.3.20), линеаризованной в окрестности особой точки (I.3.21),

$$\lambda_{1,2} = 1/2 \left\{ - [e_1 \gamma_{22}(\gamma_{11} - \gamma_{22}) + e_2 \gamma_{11}(\gamma_{12} + \gamma_{22})] \pm [e_1 \gamma_{22}(\gamma_{11} - \gamma_{22}) + e_2 \gamma_{11}(\gamma_{12} + \gamma_{22})]^2 - 4\gamma_{12}\gamma_{21}(e_1 \gamma_{22} + e_2 \gamma_{12})(e_1 \gamma_{21} - e_2 \gamma_{11}) \right\}^{1/2}.$$

Из выражения для характеристических чисел видно, что если выполнено условие

$$[e_1 \gamma_{22}(\gamma_{11} - \gamma_{22}) + e_2 \gamma_{11}(\gamma_{12} + \gamma_{22})]^2 \leq 4\gamma_{12}\gamma_{21}(e_1 \gamma_{22} + e_2 \gamma_{12})(e_1 \gamma_{21} - e_2 \gamma_{11}), \quad (I.3.22)$$

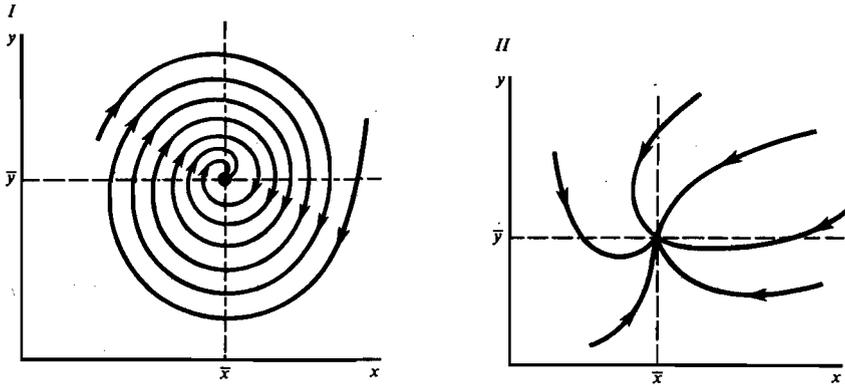


Рис. 1.13. Фазовый портрет системы [(I.3.20); объяснение см. в тексте]

то численность хищников и жертв совершает во времени затухающие колебания, система имеет ненулевую особую точку — устойчивый фокус. Фазовый портрет системы изображен на рис. 1.13, I.

Допустим, что параметры системы изменяются таким образом, что условие (I.3.22) превращается в равенство. В этом случае особая точка будет лежать на границе устойчивых фокусов и узлов. При изменении знака неравенства (I.3.22) на обратный в системе происходит бифуркация — особая точка становится устойчивым узлом (рис. 1.13, II).

При $\gamma_{ii} = 0$ система (I.3.20) сводится к негрубой системе (I.3.4) с особой точкой типа «центр». Таким образом, появление в правых частях уравнений даже небольших отрицательных нелинейных членов вызывает качественное изменение фазового портрета и превращение негрубой особой точки типа «центр» в грубую особую точку типа «устойчивый фокус» или «узел» в зависимости от соотношения параметров системы.

При добавлении положительных нелинейных членов в правые части уравнений в системе (I.3.4) появится неустойчивая особая точка типа «узел» или «фокус» в зависимости от соотношения коэффициентов. Таким образом, параметры γ_{ii} можно рассматривать как своего рода управляющие параметры, вызывающие качественную деформацию фазового портрета системы с изменением типа ее устойчивости.

Типы динамического поведения биологических систем



§ 1. Биологические триггеры

Важной особенностью биологических систем является их способность переключаться из одного режима функционирования в другой, что соответствует нескольким устойчивым стационарным состояниям системы. На фазовой плоскости такая система обладает двумя (и более) устойчивыми особыми точками. Области влияния устойчивых особых точек разделяются сепаратрисами, которые обычно проходят через неустойчивую особую точку типа «седло» (рис. II.1).

Система, обладающая двумя или несколькими устойчивыми стационарными состояниями, между которыми возможны переходы, называется триггерной. В отличие от рассмотренных в гл. I систем, имеющих единственное стационарное соотношение, в триггерных системах стационарные значения переменных зависят от начальных условий. Если система функционирует в одном из своих устойчивых режимов, малыми отклонениями ее нельзя вывести из этого режима. Однако в реальных биологических системах существуют способы переключения устойчивых стационарных состояний. Допустим, что система функционирует в устойчивом режиме a и ее необходимо перевести в другой устойчивый режим c . Это можно сделать двумя способами.

За счет внешнего воздействия можно так изменить значения переменных x и y , например резко увеличив x , что это переведет систему в некую точку c (рис. II.1), находящуюся по правую сторону сепаратрисы седла в области притяжения устойчивого узла c . После этого система уже сама по фазовой траектории перейдет в точку c и окажется в требуемом режиме. Это так называемый силовой способ переключения триггера, он называется также специфическим. В случае химической реакции для такого переключения в систему необходимо добавить некоторое количество определенного химического вещества (в данном случае вещества x).

Другим, более тонким, является способ параметрического неспецифического переключения. Здесь непосредственному воздействию подвергаются не переменные, а параметры системы, что может быть достигнуто разными способами, например изменением температуры, рН или скорости поступления субстрата. Сущность процесса параметрического переключения состоит в использовании характерной зависимости фазового портрета от некоторого управляющего параметра системы (рис. II.2).

При изменении фазового портрета сами координаты особой точки c , конечно, также несколько изменятся, поскольку они зависят от параметров системы. При возвращении к прежним значениям управляющего параметра исходный фазовый портрет системы восстановится, но она уже будет работать в требуемом режиме c .

Модели, обладающие триггерными свойствами, оказались применимыми для описания процессов эволюции. Один из них — процесс возникновения единого кода генетической информации, когда одной последовательности нуклеотидов соответствует одна последовательность аминокислот. В моделях, предложенных Д. С. Чернавским, возникновение единого кода связано с отбором одного из многих равновозможных способов кодирования генетической информации. Простейшая модель процесса отбора одного из двух

Рис. П.1. Фазовый портрет триггерной системы с двумя устойчивыми особыми точками

Количество стационарных состояний в системе определяется числом точек пересечения главных изоклин вертикальных и горизонтальных касательных (жирные линии). Точка пересечения изоклин *b* представляет собой седло, а точки пересечения главных изоклин *a* и *c*, лежащие по обе стороны от сепаратрисы седла (пунктирная линия), — устойчивые узлы. Если начальное положение изображающей точки расположено левее сепаратрисы седла, система находится в области влияния особой точки *a* и стремится к этому устойчивому стационарному состоянию. Из начальных точек, лежащих правее сепаратрисы, система будет двигаться к устойчивой особой точке *c*

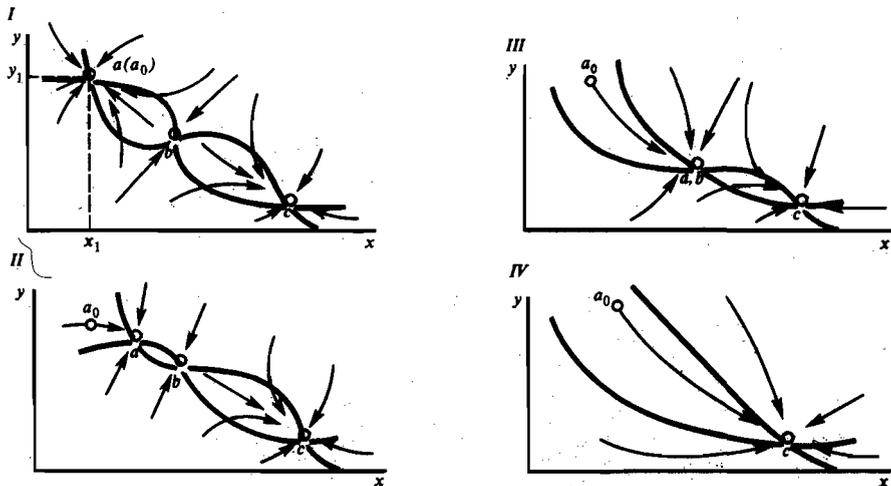
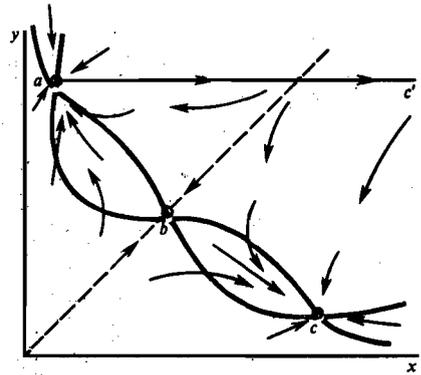


Рис. П.2. Процесс параметрического переключения триггерной системы на фазовой плоскости

При изменении управляющего параметра система, находившаяся в начале процесса переключения в точке *a(a₀)* с соответствующими координатами *x* и *y* на фазовой плоскости (I), окажется вследствие изменения фазового портрета в области притяжения устойчивого узла *c* (IV), куда она самопроизвольно перейдет (через стадии, изображенные на рис. II и III)

равноправных биологических объектов представляет собой систему двух дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= a_0 \frac{S}{k_S + S} x - \beta x - \gamma xy; \\ \frac{dy}{dt} &= a_0 \frac{S}{k_S + S} y - \beta y - \gamma xy, \end{aligned} \tag{П.1.1}$$

где x — концентрация объектов первого типа; y — концентрация объектов второго типа; S — концентрация субстрата, общего для обоих типов объектов; k_s, β, γ — константы. В модели предполагается, что объекты обоих типов при взаимодействии погибают (члены вида — γxy). Субстрат S лимитирует рост популяций, скорость прироста биомассы объектов обоих типов записана в форме Моно. Модель представляет собой триггер, две устойчивые

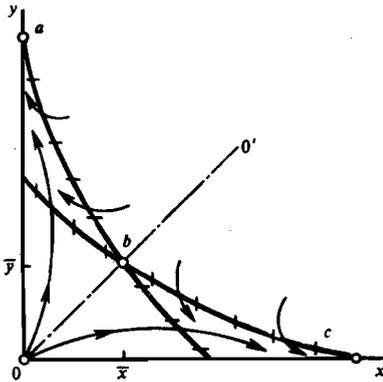


Рис. II.3.
Фазовый портрет системы антагонистических видов

В зависимости от начальных условий траектории системы устремляются либо к одной, либо к другой устойчивой стационарной точке, лежащим симметрично по обе стороны сепаратрисы ($0-0'$) седла b (a либо c)

особые точки которого расположены на координатных осях фазового портрета системы (рис. II.3).

Важно, что особая точка b является седлом. Это означает, что однородная смесь, содержащая равные количества объектов x и y , неустойчива и под влиянием сколь угодно малого возмущения «сваливается» либо в режим вымирания x и конечных значений численности y (точка a), либо в режим вымирания y и конечных численностей x (точка c). Из модели следует вывод, что неустойчивость стационарного состояния может быть одной из основных причин биологического отбора (выбор одной из двух или многих равноправных возможностей).

Способность триггерной системы к переключениям явилась предпосылкой для использования этой системы при моделировании процессов, ведущих к дифференциации тканей. С этой точки зрения каждая клетка обладает набором возможных устойчивых стационарных режимов, но фактически в данный момент времени функционирует лишь в одном из них. В процессе дифференциации и происходит переключение клетки из одного стационарного режима функционирования в другой.

Модель генетического триггера, основанная на биохимической схеме регуляции белкового синтеза у прокариот, изображена на рис. II.4.

Математическая модель процесса в безразмерном виде может быть записана следующим образом:

$$\frac{dx_1}{dt} = \frac{A_1}{1+x_2^n} - x_1; \quad \frac{dx_2}{dt} = \frac{A_2}{1+x_1^n} - x_2. \quad (\text{II.1.2})$$

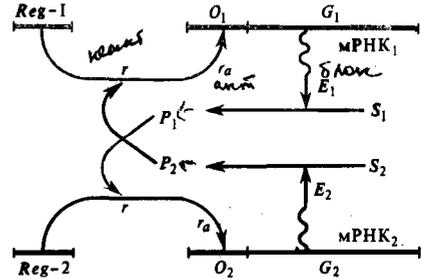
Эта модель получена путем редукции полной системы, учитывающей процессы, протекающие согласно схеме рис. II.4. Смысл переменных в системе (II.1.2) следующий: x_1 и x_2 — безразмерные концентрации специфических метаболитов — корепрессоров продуктов P_1 и P_2 . Единицей времени является характерное время ферментативных реакций — порядка минут. Параметр n отражает порядок реакций репрессии. Параметры A_1 и A_2 зависят от субстратов S_1 и S_2 , активности и содержания ферментов базового

метаболизма. В том случае, когда обе системы синтеза идентичны (потребляют одинаковое количество энергии) и концентрации субстратов S_1 и S_2 одинаковы, параметры A_1 и A_2 равны и модель (II.1.2) симметрична.

Рассмотрим поведение системы при разных значениях n . При $n=1$ система имеет одно симметричное стационарное решение, определяемое как положительный корень уравнения для стационарных концентраций: $x_2^2 + x - A = 0$.

Рис. II.4. Схема взаимной регуляции двух систем синтеза ферментов (схема Жакоба и Моно)

Ген-регулятор (*Reg*) каждой системы синтезирует неактивный репрессор (r), который, соединяясь с продуктом системы (P), образует активный комплекс (r_a). Активный комплекс, обратимо реагируя с участком структурного гена (G), называемого опероном (O), блокирует синтез мРНК. Преобразование субстрата S в продукт P проводится с участием фермента E . Таким образом, продукт второй системы P_2 является корепрессором первой системы, а P_1 — корепрессором второй. При этом в процессе корепрессии может участвовать одна, две и больше молекул продукта. Очевидно, что такой характер взаимодействия при интенсивной работе первой системы способствует блокаде второй, и наоборот



Фазовый портрет системы изображен на рис. II.5. На нем имеется одна устойчивая особая точка типа узла.

При $n=2$ число стационарных состояний равно числу положительных вещественных корней уравнения:

$$A [1 + A^2 / (1 + x^2)^2]^{-1} - x = 0.$$

При $A < 2$ имеется всего одно решение $x = \bar{x} < 1$. Оно устойчиво, а фазовый портрет системы имеет тот же вид, что и на рис. II.5. При $A \geq 2$ появляются три стационарных состояния (как на рис. II.1), система становится триггерной. Величину $x_1 = 1$ можно считать бифуркационным значением стационарных концентраций. Устойчивый узел преобразуется в седло, и в его окрестности возникают два устойчивых узла.

Таким образом, триггерный режим в системе возникает в том случае, когда в корепрессии участвуют две (или более) молекулы продукта ($n \geq 2$) и когда уровень базового метаболизма достаточно высок ($A \geq 2$).

В несимметричной модели качественная картина сохраняется, но характер бифуркации несколько меняется. В этом случае имеются два параметра A_1 и A_2 . Триггерный режим наступает только тогда, когда каждый из них больше двух, при этом фазовый портрет становится несимметричным.

В заключение следует подчеркнуть, что триггерные системы адекватно описывают одну из основных особенностей биологических систем — их спо-

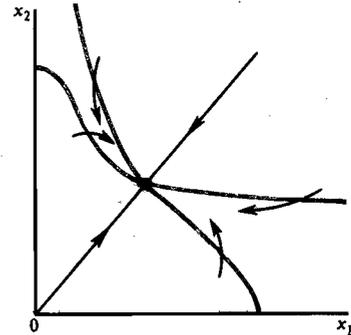


Рис. II.5. Фазовый портрет (II.1.2) при $n=1$ (по Ю. М. Романовскому, Н. В. Степановой, Д. С. Чернавскому, 1975)

способность к переключениям из одного режима в другой; именно поэтому наряду с колебательными триггерные модели получили столь широкое распространение. Некоторые из них будут подробно рассмотрены в § 2 гл. III при описании кинетических моделей ферментативного катализа.

§ 2. Колебательные процессы в биологии. Предельные циклы

В настоящее время экспериментально изучено достаточно большое количество колебательных систем в биологии: периодические биохимические реакции, колебания в гликолизе, периодические процессы фотосинтеза, колебания численности видов и т. д. Во всех этих процессах некоторые характеризующие систему величины изменяются периодически в силу свойств самой системы без какого-либо периодического воздействия извне. Подобные системы относятся к классу автоколебательных.

Автоколебательными называются системы, в которых устанавливаются и поддерживаются незатухающие колебания за счет сил, зависящих от состояния самой системы, причем амплитуда этих колебаний определяется свойствами самой системы, а не начальными условиями.

Исследование уравнений, описывающих автоколебательные системы, показывает, что на фазовой плоскости стационарное решение такой системы представляется так называемым предельным циклом (рис. II.6).

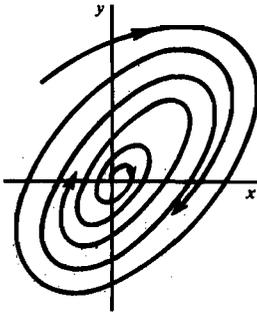


Рис. II.6.
Устойчивый предельный цикл на фазовой плоскости xy

Предельный цикл — это замкнутая кривая на фазовой плоскости, к которой в пределе при $t \rightarrow \infty$ стремятся все интегральные кривые. Предельный цикл представляет стационарный режим с определенной амплитудой, не зависящей от начальных условий, а определяющейся видом уравнений системы. Существование предельного цикла на фазовой плоскости есть основной признак автоколебательной системы. Очевидно, что при автоколебательном процессе фаза колебаний может быть любой

Для понимания некоторых общих характеристик автоколебательных систем рассмотрим систему уравнений

$$dx/dt = P(x, y); \quad dy/dt = Q(x, y). \quad (\text{II.2.1})$$

Если $T(T > 0)$ — наименьшее число, для которого при всяком t $x(t+T) = x(t)$; $y(t+T) = y(t)$, то движение $x = x(t)$; $y = y(t)$ называется периодическим движением с периодом T .

Периодическому движению соответствует замкнутая траектория на фазовой плоскости, и обратно: всякой замкнутой траектории соответствует бесконечное множество периодических движений, отличающихся друг от друга выбором начала отсчета времени. Если периодическому движению на фазовой плоскости соответствует изолированная замкнутая кривая, к которой с внешней и внутренней стороны приближаются (при возрастании t) соседние траектории по спиралям, то эта изолированная замкнутая траектория будет предельным циклом. Предельный цикл называется устойчивым, если существует такая область ϵ на фазовой плоскости, содержащая этот предельный цикл, что все

фазовые траектории, начинающиеся в окрестности ε , асимптотически при $t \rightarrow \infty$ приближаются к предельному циклу (рис. II.6).

Для исследования устойчивости периодического движения $x = \varphi(t)$, $y = \psi(t)$ можно, как показал А. А. Ляпунов, идти по пути линеаризации уравнений, подобно тому, как это делалось при исследовании устойчивости состояний равновесия.

Для нахождения предельных циклов не существует таких простых путей, как для нахождения стационарных точек и исследования их устойчивости. Однако исследование фазовой плоскости системы часто помогает дать ответ на вопрос о существовании в данной системе предельного цикла.

Предельный цикл является изолированной замкнутой траекторией в том смысле, что все фазовые траектории, проходящие в окрестности предельного цикла и не совпадающие с ним, не являются замкнутыми, а представляют собой спирали, «наматывающиеся» на предельный цикл или «смаывающиеся» с него. В этом основное отличие предельного цикла от бесконечного числа замкнутых фазовых траекторий, окружающих особую точку типа «центр», которая, как показано в § 3 гл. I, является в некотором смысле неустойчивой.

Реальные биологические системы подвергаются бесконечному числу случайных внешних и внутренних влияний, однако в устойчивом режиме функционирования динамический характер поведения системы сохраняется. В модели это соответствует сохранению качественного характера поведения переменных при произвольных малых изменениях правых частей системы уравнений. Тем самым исключается существование неизолированных (сколь угодно близких друг к другу) замкнутых кривых (как в случае особой точки типа «центр»). В системах, удовлетворяющих требованию сохранения устойчивости при малых изменениях параметров (так называемые грубые системы), могут быть только изолированные замкнутые фазовые траектории (предельные циклы).

Для движений, отображаемых устойчивым предельным циклом, период и амплитуда (точнее, весь спектр амплитуд, получающихся при разложении периодического движения в ряд Фурье) не зависят от начальных условий. Все соседние движения (соответствующие целой области начальных значений) асимптотически приближаются к периодическому движению по предельному циклу, которое имеет определенный период и определенную амплитуду.

Модель гликолиза. В настоящее время существует несколько десятков автоколебательных моделей биологических процессов различных уровней, начиная с клеточного и кончая популяционным. Их описание можно найти в специальной литературе. Классическим примером колебательной биохимической системы является гликолитическая цепь.

Напомним, что в процессе гликолиза осуществляется распад глюкозы и других сахаров, при этом соединения, содержащие шесть молекул углерода, превращаются в трикарбоновые кислоты, включающие три молекулы углерода. За счет избытка свободной энергии в процессе гликолиза на одну молекулу шестиуглеродного сахара образуется две молекулы АТФ.

Решающая роль в генерации наблюдаемых при гликолизе колебаний концентраций фруктозо-6-фосфата, фруктозо-1,6-фосфата и восстановленного НАД принадлежит ключевому ферменту гликолитического пути — фосфофруктокиназе (ФФК). Построение математической модели гликолитической цепи, включающей свыше 20 стадий, облегчается существованием нескольких узких мест, которые и определяют кинетику процесса.

Рассмотрим простейшую модель Хиггинса, в которой предполагается, что основным фактором, определяющим скорость процесса, является линейная

активация. ФФК фруктозодифосфатом. Тогда схему процесса можно представить в упрощенном виде:



Здесь [Гл] — глюкоза; Ф6Ф (фруктозо-6-фосфат) — субстрат ключевой реакции, катализируемый ферментом E_1 (ФФК); ФДФ — продукт этой реакции, который является субстратом в следующей стадии, катализируемой ферментом E_2 . Обратной стрелкой показано влияние промежуточного продукта ФДФ на активность ключевого фермента E_1 .

Введем следующие обозначения: v_1 — скорость поступления субстрата Ф6Ф в сферу рассматриваемой реакции; v_2 — скорость преобразования Ф6Ф в продукт ФДФ; v_3 — скорость расхода ФДФ в следующей стадии. Для простоты все реакции будем считать необратимыми. В принятых обозначениях уравнения для медленных переменных (концентрации субстрата Ф6Ф и продукта ФДФ) имеют вид

$$dx/dt = v_1 - v_2 = P(x, y); \quad dy/dt = v_2 - v_3 = Q(x, y), \quad (\text{II.2.3})$$

где v_2 — квазистационарная скорость ключевой ферментативной реакции; x, y — концентрация субстрата Ф6Ф и продукта ФДФ соответственно.

Будем считать, что субстрат Ф6Ф поступает в сферу реакции с постоянной скоростью

$$v_1 = k; \quad (\text{II.2.4})$$

v_2 — квазистационарная скорость реакции — определяется выражением

$$v_2 = \kappa \frac{x}{K_{m_x} + x} \cdot \frac{y}{K_{m_y} + y}, \quad (\text{II.2.5})$$

где κ — максимальная скорость рассматриваемой реакции при полном насыщении субстратом; K_{m_x} — константа Михаэлиса; K_{m_y} характеризует продуктную активацию ключевой реакции.

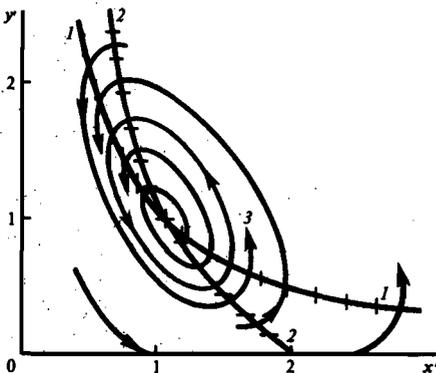


Рис. II.7.

Фазовый портрет колебаний в системе гликолиза (по Ю. М. Романовскому, Н. В. Степановой, Д. С. Чернавскому, 1971)

Изоклина вертикальных касательных (кривая 1) представляет собой гиперболу $y' = 1/x'$. Изоклины горизонтальных касательных — гипербола $x' = (1+r)/(1+ry')$ (кривая 2) и ось $y' = 0$. Кривая 3 — предельный цикл

Скорость утилизации продукта определяется медленной и необратимой реакцией, катализируемой ферментом пируваткиназой (ПК). Скорость убыли y можно записать в виде

$$v_3 = q \frac{y_7}{K'_{m_y} + y}, \quad (\text{II.2.6})$$

где K'_{m_y} — константа Михаэлиса для реакции убыли y .

С учетом (II.2.4) — (II.2.6) систему (II.2.3) можно записать в виде

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= k - x \frac{x}{K_{m_x} + x} \frac{y}{K_{m_y} + y}; \\ \frac{dy}{dt} &= x \frac{x}{K_{m_x}} \frac{y}{K_{m_y}} - q \frac{y}{K'_{m_y} + y}. \end{aligned} \quad (II.2.7)$$

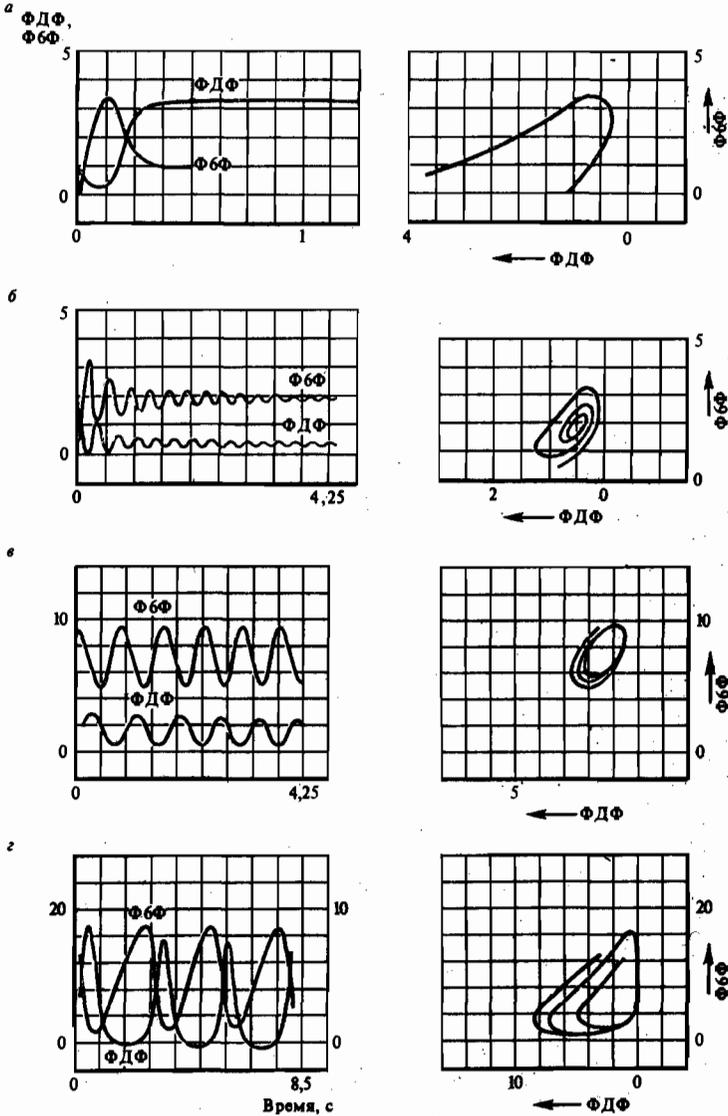


Рис. 11.8.

Кинетика изменений концентраций ФДФ (y) и Ф6Ф (x), рассчитанная с помощью ЭВМ, и фазовый портрет модели гликолиза при различных значениях констант скоростей (J. J. Higgins, 1967): а — бесколебательная кинетика, б — затухающие колебания, в — почти синусоидальные колебания, г — нелинейные колебания

Систему (II.2.7) можно привести к более простому виду, если предположить, что $K_{m_x} \gg x$, $K_{m_y} \gg y$, и произвести следующую замену переменных:

$$t' = \frac{t' x k K'_{m_y}}{K_{m_x} K_{m_y} (q-k)}; \quad x' = \frac{x k K'_{m_y}}{K_{m_x} K_{m_y} (q-k)}; \quad y' = y \frac{q-k}{k K'_{m_y}}. \quad (\text{II.2.8})$$

При этом система (II.2.7) преобразуется к виду

$$\begin{aligned} dx'/dt' &= 1 - x'y'; \\ dy'/dt' &= \alpha y' \left(x' - \frac{1+r}{1+ry'} \right). \end{aligned} \quad (\text{II.2.9})$$

где

$$\alpha = \frac{(q-k)^2 K_{m_x} K_{m_y}}{K'^2 k x}; \quad r = \frac{k}{q+k}.$$

На рис. II.7 изображен фазовый портрет системы (II.2.9).

Характер устойчивости особой точки определяется выражением для корней характеристического уравнения линеаризованной системы

$$\lambda_{1,2} = -\frac{1}{2} \left(1 - \frac{\alpha r}{1+r} \right) \pm \frac{1}{2} \sqrt{\left(1 + \frac{\alpha r}{1+r} \right)^2 - \frac{4\alpha}{1+r}}. \quad (\text{II.2.10})$$

Из выражения (II.2.10) видно, что при $\frac{4\alpha}{1+r} > \left(1 + \frac{\alpha r}{1+r} \right)^2$ имеет место особая точка типа «фокус». Если при этом $\alpha r / (1+r) \ll 1$, то фокус устойчивый, если $\alpha r / (1+r) > 1$, то фокус неустойчивый. В этом случае в окрестности особой точки возможен предельный цикл. Значение параметра $\alpha r / (1+r) = 1$ является бифуркационным. Оно отделяет область значений параметров системы, при которых в системе возможны только затухающие колебания, от той области, где возможны автоколебания.

На рис. II.8 представлены кинетика изменения во времени концентраций переменных x и y и фазовые портреты системы (II.2.7) при различных значениях параметров системы. Когда значения параметров изменяются так, что происходит переход через точку бифуркации ($\alpha r / (1+r) = 1$), то вместо устойчивой особой точки (рис. II.8, а, б) в системе возникает предельный цикл — устойчивый автоколебательный режим (рис. II.8, в, г), которому теперь и передается устойчивость.

§ 3. Иерархия времен в биологических системах

Задача моделирования состоит в том, чтобы построить модель явления, содержащую возможно меньшее число переменных и параметров и в то же время правильно отражающую основные свойства явления (например, устойчивость стационарных состояний, колебательность, триггерность, квазистохастические свойства и т. д.). Проблема сокращения исходного числа переменных (упрощение модели) оказывается относительно легко разрешимой в том случае, когда в системе имеет место иерархия времен: совместно протекающие процессы сильно отличаются по своим характерным временам (см. § 1, гл. I).

В химической кинетике метод редукции систем дифференциальных уравнений в соответствии с иерархией характерных времен изменения отдельных переменных получил название метода квазистационарных концентраций. Обычно его применяют при исследовании систем химических реакций, промежуточные продукты которых являются частями с большой

реакционной способностью. К таким реакциям относятся в первую очередь все каталитические, а также свободнорадикальные и цепные реакции.

Важной особенностью процессов, идущих с участием активных промежуточных частиц, является установление за малый промежуток времени (в течение которого относительное изменение концентраций исходных веществ невелико) режима, при котором разность скоростей образования v_o и распада v_p промежуточных соединений становится малой по сравнению с этими скоростями. Это означает, что концентрация промежуточных веществ практически не меняется. Такой режим называется квазистационарным, а отвечающие ему концентрации активных промежуточных частиц — квазистационарными концентрациями.

В квазистационарном режиме дифференциальные уравнения для изменений концентраций каждого из промежуточных соединений R_i

$$dR_i/dt = v_o^i - v_p^{(i)} \quad (i=1, 2, \dots, l)$$

можно заменить, пренебрегая малой величиной dR_i/dt , алгебраическими:

$$v_o^i - v_p^{(i)} = 0 \quad (i=1, \dots, l).$$

Здесь $v_o^{(i)}$ и $v_p^{(i)}$ — функции концентраций исходных веществ и самих активных промежуточных соединений, поэтому из алгебраических уравнений можно выразить l квазистационарных концентраций стабильных химических веществ. По мере расходования этих веществ квазистационарные концентрации промежуточных соединений будут меняться, но если время установления квазистационарного режима мало, он не будет нарушаться на протяжении всего процесса. Конечно, такое рассмотрение неправомерно на начальных стадиях процесса, в течение которых концентрации промежуточных соединений изменяются от нуля до своих квазистационарных значений (период индукции).

Таким образом, для группы быстро изменяющихся переменных можно не записывать дифференциальных уравнений, поскольку они практически мгновенно по сравнению с остальными, более медленными, достигают своих стационарных значений. Тогда для быстрых переменных вместо дифференциальных уравнений, описывающих их поведение во времени, можно записать алгебраические уравнения, определяющие их стационарные значения, которые, в свою очередь, могут быть подставлены в дифференциальные уравнения для медленных переменных уже в качестве параметров. Таким путем осуществляется редукция, т. е. уменьшение числа дифференциальных уравнений полной системы, которая теперь будет включать лишь медленные переменные, зависящие от времени.

Рассмотрим в качестве примера некоторый процесс, описываемый системой двух дифференциальных уравнений:

$$dx/dt = \varphi(x, y); \quad dy/dt = G(x, y), \quad (\text{II.3.1})$$

где y — медленная, а x — быстрая переменная. Это означает, что отношение приращений Δy и Δx за короткий промежуток времени Δt много меньше единицы: $\Delta y/\Delta x \ll 1$.

Запишем систему (II.3.1) в более удобном для исследования виде. Воспользуемся тем фактом, что скорость изменения переменной x значительно превосходит скорость изменения переменной y . Это позволяет представить функцию $\varphi(x, y)$ в виде произведения некоей большой величины $A \gg 1$ на функцию $F(x, y)$, соответствующую по порядку величины функции $G(x, y)$.

Итак, второе уравнение системы (II.3.1) преобразовано к виду $dx/dt = AF(x, y)$.

Разделив левую и правую части этого уравнения на A и обозначив $\varepsilon = 1/A$, получим полную систему уравнений, тождественную системе (II.3.1):

$$dy/dt = G(x, y); \quad \varepsilon dx/dt = F(x, y), \quad (\text{II.3.1a})$$

где $\varepsilon \ll 1$. Упростить полную систему (II.3.1) можно, только если характер решения этой системы не изменится при устремлении малого параметра ε к нулю. Тогда можно совершить предельный переход $\varepsilon \rightarrow 0$ и получить из второго дифференциального уравнения системы (II.3.1) алгебраическое. Упрощенная (вырожденная) система имеет вид

$$dy/dt = G(x, y); \quad F(x, y) = 0. \quad (\text{II.3.2})$$

Рассмотрим фазовый портрет полной системы (II.3.1) на рис. II.9.

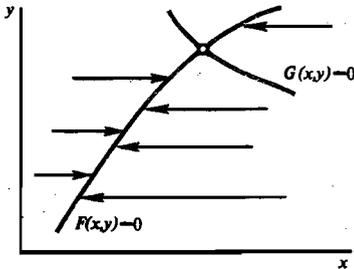


Рис. II.9.

Фазовый портрет полной системы (II.3.1) Характер фазовых траекторий системы определяется расположением главных изоклин системы, описываемых уравнениями: $G(x, y) = 0$ (изоклина горизонтальных касательных) и $F(x, y) = 0$ (изоклина вертикальных касательных). Точка их пересечения — особая точка полной системы, а ее координаты — стационарные значения переменных x, y

Важнейшей особенностью фазового портрета системы является наличие областей на плоскости x, y , резко отличающихся по скоростям изменения в них переменных. Действительно, фазовые траектории в любой точке фазовой плоскости, за исключением ε -окрестности кривой $F(x, y) = 0$, имеют наклон, тангенс угла которого определяется уравнением

$$\frac{dy}{dx} = \varepsilon \frac{G(x, y)}{F(x, y)} \approx \varepsilon \ll 1,$$

т. е. расположены почти горизонтально. Это так называемые области быстрых движений, в которых вдоль фазовой траектории y постоянно, а x быстро меняется. Достигнув по одной из таких горизонталей ε -окрестности кривой $F(x, y) = 0$, изображающая точка начнет затем двигаться по этой кривой. Скорость движения по горизонтальным участкам траектории $dx/dt \approx 1/\varepsilon = A$, т. е. очень велика по сравнению со скоростью движения в окрестности кривой $F(x, y) = 0$. Поэтому общее время достижения стационарного состояния x, y , лежащего на кривой $F(x, y) = 0$, определяется характером движения вдоль этой кривой, т. е. фактически зависит от начальных значений медленной переменной y и не зависит от начального значения быстрой переменной x .

Вырожденная система (II.3.2) содержит одно дифференциальное уравнение

$$dy/dt = G(x, y) \quad (\text{II.3.3})$$

и одно алгебраическое

$$F(x, y) = 0, \quad (\text{II.3.4})$$

задающее связь между переменными x и y . Плоскость xy вырожденной системы содержит лишь одну кривую, задаваемую уравнением $F(x, y) = 0$ и, по

существо, отражающую зависимость стационарных значений величины x от параметра y для уравнения (II.3.3).

В вырожденной системе (II.3.2) не отражаются быстрые горизонтальные движения по фазовым траекториям полной системы. Из любой точки, соответствующей начальным условиям x_0, y_0 , изображающая точка системы (II.3.2) скачком ($y = y_0 = \text{const}$, x мгновенно меняется) переходит на кривую $F(x, y) = 0$. Таким образом, кривая стационарных значений переменной x в зависимости от параметра y вырожденной системы совпадает с изоклиной вертикальных касательных полной системы.

Для правомерности замены полной системы уравнений вырожденной необходимо, чтобы независимо от начальных условий изображающая точка полной системы быстро переходила на изоклину вертикальных касательных $F(x, y) = 0$. Это означает, что начальные условия x_0 должны попасть в область влияния особой точки присоединенного уравнения $\epsilon dx/dt = F(x, y)$, поскольку особые точки $\bar{x}(\frac{dx}{dt} | \bar{x} = 0)$ этого уравнения как раз расположены на кривой $F(x, y) = 0$. Иными словами, необходимо, чтобы решение $x = \bar{x}(y)$ алгебраического уравнения $F(x, y) = 0$ было в то же время устойчивой изолированной особой точкой присоединенного дифференциального уравнения $\epsilon dx/dt = F(x, y)$ при всех значениях y , где y уже играет роль параметра (теорема А. Н. Тихонова, 1952).

Если система уравнений, описывающая процессы в биологической системе, содержит несколько уравнений с малым параметром перед производной, все эти уравнения, описывающие изменения быстрых переменных, можно заменить алгебраическими, причем, если имеются параметры различной степени малости, редукцию следует производить последовательно.

В уравнениях химической и биологической кинетики роль малых параметров часто играют постоянные времени быстрых процессов различных порядков. В других случаях в качестве малого параметра выступает отношение малых концентраций к большим. Это также соответствует различным скоростям изменения переменных, поскольку скорость изменения большой концентрации, как правило, меньше, чем скорость изменения малой концентрации. Такая ситуация часто возникает при анализе ферментативных процессов (см. гл. III).

В случае системы уравнений для двух переменных, одна из которых быстрая (II.3.1a), можно легко сделать вывод о том, какие из точек кривой $F(x, y) = 0$ соответствуют устойчивым решениям $x = \bar{x}(y)$ присоединенного уравнения $\epsilon dx/dt = F(x, y)$, где y — параметр (устойчивость точек этой кривой определяется знаком производной $F'_x(x, y)$, причем те точки кривой $F(x, y) = 0$, в которых $F'_x > 0$, являются неустойчивыми, а те точки, для которых $F'_x < 0$, — устойчивыми). Изображающая точка в зависимости от знака производной $F'_x(x, y)$ будет быстро двигаться либо по направлению к квазистационарной кривой при $F'_x < 0$, либо от нее при $F'_x > 0$. Движение по самой кривой $F(x, y) = 0$ есть медленное движение, и оно происходит в соответствии с уравнением $dy/dt = G(x, y)$. Если $G(x, y) > 0$, то движение происходит вдоль $F(x, y) = 0$ так, что значения y растут, если же $G(x, y) < 0$, то при движении y уменьшается. Рассмотрим систему для случая, когда $F(x, y) = 0$ представляет собой немонотонную кривую.

На рис. II.10 изображена ситуация, когда особая точка полной системы расположена на неустойчивой ветви AB кривой $F(x, y) = 0$. Если же особая точка полной системы лежит на устойчивой ветви кривой $F(x, y) = 0$, то состояние равновесия устанавливается после одного колебания.

В общем случае поведение системы зависит от ее структуры и характера

протекающих в ней процессов, т. е. от вида полной системы уравнений модели, в особенности от расположения особых точек, и требует в каждом конкретном случае специального исследования.

Так, в системе (II.3.2) переменную y можно рассматривать как управляющий параметр. В этом смысле рассмотренная система аналогична системе (I.2.5) (α — параметр):

$$dx/dt = f(x, \alpha). \quad (\text{II.3.5})$$

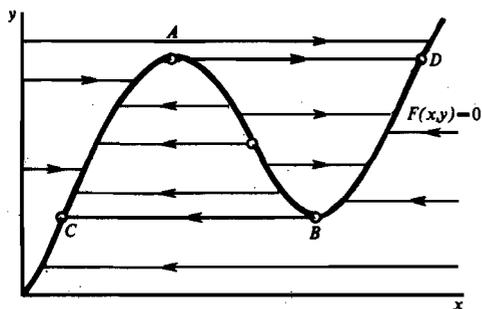


Рис. II.10.
Фазовый портрет вырожденной системы (II.3.2)

Особая точка расположена на неустойчивой ветви кривой $F(x, y) = 0$. В точках изменения знака производной $F'_x(x, y)$ происходят скачки (точка A и B). В этих точках сменяется характер устойчивости, так как в соответствии со знаком производной $F'_x(x, y)$ ветви CA и BD устойчивы, а ветвь AB неустойчива. Таким образом, точки A и B являются бифуркационными. В соответствии со знаком $dy/dt = G(x, y)$ изображающая точка системы медленно доходит по ветви CA до точки A. Далее по кривой $F(x, y) = 0$ изображающая точка двигаться не может, так как ветвь AB неустойчива. Поэтому система быстро переходит по горизонтальной изоклине AD на устойчивую ветвь кривой $F(x, y) = 0$. Однако на этой ветви в соответствии со знаком $dy/dt = G(x, y) \leq 0$ движение происходит вниз в направлении точки B, которая, так же как и точка A, является бифуркационной. Далее снова следует быстрый горизонтальный скачок BC. Затем точка движется по ветви CA. Таким образом, система совершает разрывные автоколебания по замкнутой траектории — разрывному предельному циклу $ADBC$.

В этой системе не задано в явном виде изменение во времени величины α , в результате которого, собственно, и происходит движение по кривой стационарных состояний $x = x(\alpha)$. Для полного описания этого движения необходимо задать дополнительное уравнение вида

$$d\alpha/dt = \varphi(\alpha, x), \quad (\text{II.3.6})$$

описывающее изменение α во времени за счет неких сил, внешних по отношению к переменной x .

Уравнения (II.3.5), (II.3.6) образуют вместе систему двух уравнений с двумя неизвестными x, α :

$$dx/dt = f(x, \alpha); \quad d\alpha/dt = \varphi(\alpha, x). \quad (\text{II.3.7})$$

Очевидно, скорость изменения α во времени в уравнении (II.3.6) должна быть значительно меньше скорости изменения x , т. е.

$$\varphi(\alpha, x) \ll f(x, \alpha). \quad (\text{II.3.8})$$

Именно при выполнении условия (II.3.8) можно считать α постоянным параметром в уравнении (II.3.5). Действительно, при этом α не успевает сколько-нибудь существенно измениться за время изменения переменной x . В то же время стационарные состояния в системе (II.3.7) по концентрациям x будут каждый раз устанавливаться заново по мере постепенного изменения α . Нетрудно видеть, что для такой системы x играет роль быстрого, α — медленного переменного. Соответствующая вырожденная система имеет вид

$$f(x, \alpha) = 0; \quad d\alpha/dt = \varphi(\alpha, x). \quad (\text{II.3.9})$$

Подробный пример, иллюстрирующий применение теоремы Тихонова при расслоении переменных биологической системы на быстрые и медленные, разобран в гл. III.

§ 4. Процессы самоорганизации в распределенных биологических системах

До сих пор рассматривались так называемые «точечные» системы, в которых процессы, описываемые дифференциальными уравнениями, протекают одинаково во всех точках пространства. Между тем высокая степень согласованности различных процессов в клетке достигается за счет их разделения не только во времени, но и в пространстве.

В химической реакции, происходящей в объеме V , принимает участие n веществ (считая продукты реакции). Пусть $c_1(t, r), c_2(t, r), \dots, c_n(t, r)$ — концентрации этих веществ в момент времени t в точке r . Изменение концентраций во времени происходит за счет двух процессов: химических превращений веществ в ходе реакций и диффузии отдельных веществ из областей с высокой концентрацией в область с меньшей концентрацией. Системы, в которых учитываются «диффузионные связи» между отдельными точками пространства, называются распределенными.

Пусть скорость изменения концентрации i -го вещества за счет химической реакции есть

$$f_i = f_i(c_1, c_2, \dots, c_n, r, t).$$

Эта скорость зависит от концентраций всех компонентов реакции в точке r , а также непосредственно от r и t , так как внешние параметры, такие, например, как температура, могут быть различны в разных точках r и меняться со временем.

Уравнение диффузии. Рассмотрим роль процессов диффузии в изменении концентрации c_i в момент времени t в точке r , т. е. $c_i(t, r)$. Для простоты возьмем реакционный сосуд, имеющий вид длинной узкой трубки с поперечным сечением S (рис. II.11). Выделим в ней элементарный объем ΔV с координатами r и $r + \Delta r$; тогда $\Delta V = S\Delta r$. Масса ΔM_r вещества, протекающего через сечение трубки в точке r , пропорциональна градиенту концентрации $\Delta c_i / \Delta r$ вещества c_i в направлении r и величине промежутка времени от t до $t + \Delta t$, в течение которого протекает диффузия:

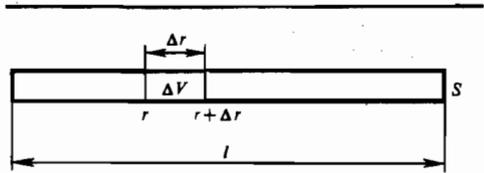


Рис. II.11. Схема реакционного сосуда

$$\Delta M_r = -D \frac{\Delta c_i(r, t)}{\Delta r} S \Delta t.$$

Здесь D — коэффициент диффузии, определяемый свойствами растворенного вещества и растворителя. Через другую границу выделенного объема с координатой $r + \Delta r$ в обратном направлении за тот же промежуток времени диффундирует масса

$$\Delta M_{r+\Delta r} = D \frac{\Delta c_i(r + \Delta r, t)}{\Delta r} S \Delta t.$$

Таким образом, общее изменение массы вещества в элементарном объеме ΔV за счет диффузии будет

$$\Delta M = \Delta M_{r+\Delta r} + \Delta M_r = \frac{DS \Delta t}{\Delta r} [-\Delta c_i(r, t) + \Delta c_i(r + \Delta r, t)],$$

а изменение концентрации c_i за счет диффузии составит

$$\Delta c_i = \frac{\Delta M}{\Delta V} = \frac{\Delta M}{S \Delta r} = \frac{1}{\Delta r} \left[\frac{\Delta c_i(r + \Delta r, t)}{\Delta r} - \frac{\Delta c_i(r, t)}{\Delta r} \right] D \Delta t.$$

Переходя к пределу при $\Delta r \rightarrow 0$, получим

$$\Delta c_i = D \Delta t \frac{\partial^2 c_i(r, t)}{\partial r^2}.$$

Отсюда легко найти скорость изменения концентрации Δc_i в объеме ΔV за счет процессов диффузии. При $\Delta t \rightarrow 0$ имеем

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = D_i \frac{\partial^2 c_i(r, t)}{\partial r^2}.$$

Итак, если предположить, что скорости химических реакций не зависят явно от координаты и времени и в системе отсутствуют «гидродинамические потоки» — систематические неслучайные движения реагирующих веществ, то в одномерном случае распределенная система реакция—диффузия описывается дифференциальными уравнениями в частных производных:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = f_i(c_1, c_2, \dots, c_n) + D_i \frac{\partial^2 c_i(r, t)}{\partial r^2} \quad (i=1, 2, \dots, n), \quad (\text{II.4.1})$$

где $f_i(c_1, \dots, c_n)$ соответствует точечной модели и описывает изменение концентрации c_i в каждой точке пространства за счет химических превращений, а

$D_i \frac{\partial^2 c_i(r, t)}{\partial r^2}$ — процессам переноса между соседними точками пространства.

Чтобы выделить единственное решение системы уравнений (II.4.1), необходимо задать начальные условия

$$C_i(0, r) = \varphi_i(r) \quad (i=1, \dots, n) \quad (\text{II.4.2})$$

и условия на границе области V . Простейшее граничное условие — непроницаемость границ области V , от которых частицы отражаются, — имеет следующий вид:

$$\left. \frac{\partial c_i}{\partial \bar{n}} \right|_{\substack{r \in \partial V \\ t > 0}} = 0 \quad (i=1, \dots, n), \quad (\text{II.4.3})$$

где \bar{n} — вектор нормали к границе области V . Условие

$$\left. \frac{\partial c_i}{\partial \bar{n}} \right|_{\substack{r \in \partial V \\ t > 0}} = \varphi(r)$$

описывает поток вещества через границу.

Другой тип граничных условий — поглощение на границе:

$$c_i(t, r)_{r \in \partial V, t > 0} = 0.$$

Частичному поглощению и частичному отражению на границе соответствует граничное условие

$$\alpha c_i(t, r) + \beta \left. \frac{\partial c_i}{\partial \bar{n}} \right|_{\substack{r \in \partial V \\ t > 0}} = 0.$$

Если область V совпадает со всем пространством, граничных условий ставить не нужно.

Распределенная система (II.4.1) может быть сведена к точечной системе

$$dc_i/dt = f_i(c_1, c_2, \dots, c_n) \quad (i=1, \dots, n).$$

в следующих случаях. Во-первых, когда все коэффициенты диффузии $D_i = 0$. В этом случае молекулы вообще не будут сталкиваться друг с другом и химическая реакция невозможна. Во-вторых, если коэффициенты диффузии очень

велики ($D_i \rightarrow \infty$), то скорости диффузии будут велики по сравнению со скоростями химических реакций. В этом случае после некоторого периода индукции решение системы (II.4.1) станет близко к решению точечной системы

$$\bar{c}_i = \bar{f}_i(c_1, c_2, \dots, c_n) \quad (i = 1, \dots, n),$$

где f_i — усредненные по объему скорости. Наконец, если внешние условия и начальные концентрации однородны во всем объеме: $\varphi_i(r) = \varphi_i = \text{const}$, то достаточно рассматривать точечную систему.

Устойчивость стационарных режимов. Как и в случае моделей в обыкновенных дифференциальных уравнениях, особый интерес представляет исследование стационарных режимов, устанавливающихся в системе с течением времени. Стационарные решения находят из условий равенства нулю производных по времени:

$$D_i \frac{\partial^2 c_i(r)}{\partial r^2} + f_i(c_1, c_2, \dots, c_n) = 0. \quad (\text{II.4.4})$$

В качестве простого примера выберем граничные условия непроницаемости концов одномерного реактора длиной от 0 до l

$$\left. \frac{\partial c_i}{\partial r} \right|_{r=0} = 0, \quad \left. \frac{\partial c_i}{\partial r} \right|_{r=l} = 0.$$

Ясно, что стационарные решения точечной системы не зависят от r и удовлетворяют уравнению (II.4.4), т. е. являются одновременно стационарными решениями распределенной системы, однородными по пространству. Однако в распределенной системе могут быть и стационарные, неоднородные по пространству решения, найти которые значительно сложнее. Исследование вопроса устойчивости стационарных решений аналогично исследованию на устойчивость стационарных решений точечной системы. $c(r)$ является устойчивым стационарным распределением концентраций вдоль координаты r , если решение $c_\xi(t, r)$ возмущенной системы, в которой в начальный момент времени при $t=0$ взято «возмущенное» распределение концентраций $c(0, r) = c(r) + \xi(0, r)$, будет при $t > 0$ мало отличаться от стационарного решения, т. е. $c_\xi(t, r) \approx c(r)$. Как правило, исследование устойчивости стационарного решения можно провести на основе анализа системы уравнений, линеаризованных вблизи особой точки.

Рассмотрим вопрос об устойчивости однородных в пространстве решений, ограничиваясь уравнением с одной переменной:

$$\frac{\partial c(t, r)}{\partial t} = f(c) + \frac{\partial^2 c(t, r)}{\partial r^2}. \quad (\text{II.4.5})$$

Подставляя в это уравнение «возмущенное» решение $c(t, r) = \bar{c}(r) + \xi(t, r)$ и учитывая, что $\bar{c}(r)$ удовлетворяет соотношению $f(\bar{c}) + d^2\bar{c}/dr^2 = 0$, получим следующее уравнение для возмущений:

$$\frac{\partial \xi(t, r)}{\partial t} = Q\xi(t, r) + \frac{\partial^2 \xi(t, r)}{\partial r^2}. \quad (\text{II.4.6})$$

где $Q = f'(\bar{c})$. Ясно, что для $\xi(t, r)$ справедливы те же граничные условия (II.4.5), что и для $c(t, r)$:

$$\left. \frac{d\xi}{dr} \right|_{r=0, l} = 0.$$

Поскольку граничные условия для этих уравнений совпадают, можно

записать выражение для решения уравнения (II.4.6) в виде

$$\xi(t, r) = \sum_{n=0}^{\infty} a_n t \exp \left\{ \left[Q - \left(\frac{n\pi}{l} \right)^2 \right] Dt \right\} \cos \left(\frac{n\pi}{l} \right) r.$$

Здесь величины $\exp \left\{ \left[Q - \left(\frac{n\pi}{l} \right)^2 \right] Dt \right\}$ задают временной характер затухания

или нарастания начального возмущения $\xi(0, r)$, а множители $\cos [n\pi/(lr)]$ определяют распределение начального отклонения вдоль координаты r .

Ясно, что если $Q = f'c(c) < 0$, то при любом $n=0, 1, 2, \dots$ функция $\xi(t, r) \rightarrow 0$ при $t \rightarrow \infty$. Наоборот, при $Q > 0$ стационарное состояние неустойчиво, что означает развитие возмущений стационарного решения. Последнее утверждение верно только в случае тех гармоник, для которых $n^2\pi^2/l^2 < Q$.

Исследование на устойчивость неоднородных по пространству решений более сложно.

В трехмерном пространстве при $n \geq 2$ решение системы (II.4.1) — (II.4.3) даже на ЭВМ представляет большие трудности.

Базовые модели. Основные результаты, описывающие процессы эволюции распределенных систем во времени и пространстве, были получены на так называемых базовых моделях, рассматривающих взаимодействие двух переменных x, y в одномерном пространстве (пространственная координата r). Общий вид такой системы:

$$\frac{\partial x}{\partial t} = P(x, y) + D_x \frac{\partial^2 x}{\partial r^2}; \quad \frac{\partial y}{\partial t} = Q(x, y) + D_y \frac{\partial^2 y}{\partial r^2}. \quad (\text{II.4.7})$$

Оказалось, что сравнительно простая модель (II.4.7) при определенном выборе вида функций P и Q может качественно описать наблюдаемые в живых системах процессы, связанные с самопроизвольным возникновением волн и структур, — процессы саморганизации.

Процессами самоорганизации называются явления, при которых в системах вследствие неустойчивости утрачивается исходная организация в пространстве и во времени и вместо нее устанавливается новая. Например, в химической реакционной системе при определенных условиях стационарное пространственно-одномерное распределение реагентов может стать неустойчивым и на смену ему придут автоколебания, т. е. устойчивые самоподдерживающиеся периодические колебания или волны химической активности.

В табл. II.1 приведена сводка известных автоволновых процессов, наблюдаемых в биологических и химических системах.

Из табл. II.1 видно, что наиболее быстрые процессы связаны с распространением электрических импульсов — сигналов, служащих для регуляции биологических процессов. Это нервные импульсы, быстрые волны в нейронных сетях мозга, волны возбуждения в мышцах. Средние скорости процессов наблюдаются в химических реакциях; малые скорости — иногда внутри живых клеток, они связаны с механизмами немышечной подвижности.

Условия, необходимые для возникновения процессов самоорганизации, могут быть сформулированы следующим образом:

1. Система является термодинамически открытой, т. е. может обмениваться веществом и энергией с внешней средой.
2. Динамические уравнения системы нелинейны.
3. Отклонения от равновесия превышают критическое значение (которое может быть и нулем).

Таблица II.1. Экспериментально наблюдаемые автоволновые процессы

Объект	Тип АВ-процесса	Скорость БФ или БИ	Характерный размер, длина волны
Окисление броммалоновой кислоты в присутствии катализирующих ионов церия или железа (реакция Белоусова — Жаботинского)*	СА, СВ, КСВ БИ, ВЦ, ДС БФ, БИ	0—10 см/с 21 м/с	1—10 мм 2—6 см
Аксон кальмара			
Ламелла нормальных фибробластов	БИ	0,2 мкм/с	10 мкм
Икра пресноводной рыбы («волна» освобождающегося кальция)	БИ	8 мкм/с	—
Неоднородная активность ферментов в цитоплазме	ДС	0	—
Плазмодий миксомицета	БИ, СА, СВ	30 мкм/с	3—5 мм
Культура ткани из миофибрилл	БИ	50—200 мкм/с	10—20 мкм
Проводящая система сердца*	БФ, БИ, ВЦ	25—300 см/с	1,5—150 см
Мышца миокарда собаки*	БИ	30 см/с	3 см
Дельтовидная мышца собаки	БИ	5 м/с	5 см
Гладкие мышцы	БИ	5—10 см/с	—
Нейронная сеть*:			
быстрые волны	КСВ, БИ	10—50 см/с	2—12 см
медленные волны	БИ	2—5 мм/мин	6—25 мм
Популяция амебоподобных клеток*	БИ, ВЦ	40 мкм/с	1 см
Коралловые полипы	БИ	50 см/с	1 см

Условные обозначения. БИ, БФ — распространение возмущения в виде бегущего импульса или бегущего фронта; ВЦ — генерация волн автономными источниками импульса активности, так называемыми ведущими центрами; ДС — стационарные неоднородные распределения кинетических переменных в пространстве; КСВ — квазистохастические волны; СА — синхронные автоколебания во всем пространстве; СВ — спиральные волны.

* В этих системах возможны процессы, имеющие этапы, на которых изменения переменных происходят с сильно различающимися характерными временами; в них могут осуществляться различные классы АВ-процессов.

4. Микроскопические процессы в системе происходят кооперативно (самосогласованно).

Явления самоорганизации играют особо важную роль для обеспечения пространственно-временной координации в развивающихся биологических системах. Например, пространственная самоорганизация обеспечивает первичные акты пространственной дифференцировки в эмбриональных тканях.

Известно, что клеточная дифференцировка играет ключевую роль в развитии и проявляется в том, что отдельные клетки и целые ткани претерпевают переходы из одного типа специализации в другой. Такие переходы — следствие включения одних и выключения других генов. На ранних стадиях эмбриогенеза клетки обмениваются друг с другом различными метаболитами, в том числе регуляторами генетической активности — морфогенами. В недифференцированных тканях имеет место однородное распределение морфогенов. Когда распределение морфогенов по ансамблю клеток становится неоднородным, образуются фенотипически наблюдаемые морфологические структуры.

Ключевую роль в формировании пространственно неоднородных распределений морфогенов играет неустойчивость, разрушающая исходное однородное состояние (А. М. Тьюринг, 1952). Этот вывод был сделан на основании анализа модели (II.4.7), в которой функции $P(x, y)$ и $Q(x, y)$ описывают образование и распад морфогенов. Тьюринг показал, что однородное стационарное распределение реагентов x , y (где x , y — стационарные решения точечной систе-

мы $P(\bar{x}, \bar{y}) = 0$; $Q(\bar{x}, \bar{y}) = 0$) при определенных значениях параметров, характеризующих кинетику производства и распада морфогенов, может стать неустойчивым по отношению к возмущениям вида $\delta \sim \exp(\lambda t + ikr)$ при определенных $k = k_{кр}$ $\text{Re} \lambda(k \sim k_{кр}) \geq 0$.

Такие ^{кр} возмущения, называемые неустойчивыми модами, однажды возникнув за счет случайных флуктуаций, будут развиваться, нарастая по амплитуде. Однако амплитуда не будет нарастать беспредельно — ее стабилизируют нелинейные эффекты. В итоге в системе сформируется стационарное пространственно неоднородное распределение реагентов (диссипативная структура), которое обуславливает процесс позиционной (зависящей от пространственного положения) дифференцировки ткани.

В результате тщательных экспериментальных исследований одного из простых организмов — гидры — были выявлены два типа морфогенов: активатор и ингибитор. Эксперименты показали, что после удаления головы, когда в ходе роста размер гидры превысит некий минимальный, на месте прежней головы возникает новая. Таким образом, увеличение размера гидры способствовало позиционной дифференцировке.

Для интерпретации этого явления была предложена модель, исследование которой показало, что при увеличении размера в системе может возникать неустойчивость, нарушающая однородное распределение веществ (А. Гирер и Р. Майнхардт, 1972). В частности, это относится к распределению вдоль тела гидры концентраций двух морфогенов: короткодействующего активатора и далекодействующего ингибитора процессов формирования головы.

Вопросами о том, какие механизмы обуславливают возникновение неустойчивости и как происходит переход к новому упорядоченному состоянию, занимается новая междисциплинарная отрасль науки, получившая название синергетики (Г. Хакен, 1980).

Результаты, полученные в синергетике, важны не только для биологии развития, но и теории автоколебательных и автоволновых процессов в биологии, для понимания закономерностей распространения нервного импульса. Удалось вывести универсальное уравнение, описывающее пространственную самоорганизацию, которому, в частности, подчиняются процессы формирования пространственно неоднородных распределений химических регуляторов в моделях Тьюринга и Гирера—Майнхардта.

Физическая идея, позволившая добиться успеха, состоит в том, что в системах, близких к порогу тьюринговской неустойчивости, имеет место резкая иерархия времен. В этой области все моды быстро релаксируют, кроме критической, которая вместе с близкими к ней модами эволюционирует крайне медленно. В силу этого на больших отрезках времени поведение системы целиком определяется эволюцией критических и околочитических возмущений. В физической теории фазовых переходов амплитуды медленно эволюционирующих мод рассматриваются как параметры порядка, для которых справедливо уравнение Гинзбурга—Ландау

$$\frac{\partial U}{\partial t} = \mu U + \alpha U |U|^2 + \frac{\partial^2 U}{\partial r^2}. \quad (\text{II.4.8})$$

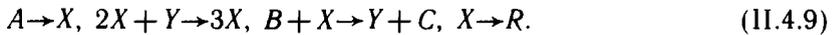
Медленно меняющаяся критическая мода с амплитудой $u(r, t)$ играет роль параметра порядка. Малый параметр μ характеризует отклонение от критической точки, t — время, r — пространственная координата, $U(r, t)$ — амплитуда критической моды: $u_i = U(r, t) e^{ik_r r} U_i^k + k_i c$. Величина α определяется нелинейными эффектами и в каждом конкретном случае вычисляется явно.

Уравнение (II.4.8) имеет фундаментальное значение и может описывать

отдельные процессы структурообразования в различных самоорганизующихся системах. Однако оно не отражает, конечно, биологического «смысла» развития и эволюционных процессов организмов.

В настоящее время теория самоорганизации в биологических системах еще далека от завершения и не всегда может дать строгое количественное описание реальных явлений. Тем не менее она показала возможность пространственно-временной самоорганизации первоначально однородных систем. Сейчас уже разработан ряд удачных базовых моделей, описывающих качественные особенности конкретных явлений: распространение волны концентрации в системах с диффузией, модель Тьюринга, модель дифференцировки тканей Гирера—Майнхардта, модель распределенного генетического триггера Д. С. Чернавского, построенная на базе уравнений (II.1.1). Одна из наиболее продуктивных моделей, так называемый «брюсселятор», будет рассмотрена в качестве примера.

Брюсселятор. Пусть в некотором замкнутом сосуде — трубке длиной L — при постоянной температуре осуществляется цепочка химических превращений веществ A, B, X, Y, C, R по следующей гипотетической схеме:



Будем считать, что изначальные вещества A и B распределены в трубке равномерно и их запас велик, так что они практически не расходуются. Вещества R и C выпадают в виде осадка. Вещества X и Y могут диффундировать вдоль трубки, их концентрация меняется в ходе химических превращений, они представляют собой переменные системы. Концентрации A и B и коэффициенты диффузии D_x и D_y — постоянные параметры системы. Торцы трубки, так же как ее стенки, предполагаются непроницаемыми для веществ, участвующих в реакции. При сделанных предположениях модель системы представляется в виде системы следующих уравнений в частных производных:

$$\frac{\partial x}{\partial t} = A + X^2 Y - (B+1)X + D_x \frac{\partial^2 X}{\partial r^2}; \quad \frac{\partial y}{\partial t} = BX - X^2 Y + D_y \frac{\partial^2 Y}{\partial r^2}. \quad (\text{II.4.10})$$

Первым шагом в исследовании системы (II.4.10) является определение ее стационарного во времени и однородного по пространству решения. Для нахождения такого решения рассмотрим точечную систему, в которой отсутствуют диффузионные члены, и приравняем нулю производные по времени. Получим единственное стационарное решение:

$$\bar{X} = A; \quad \bar{Y} = B/A. \quad (\text{II.4.11})$$

Фазовые портреты точечной системы изображены на рис. II.12.

Вернемся к распределенной системе (II.4.10). Исследуем устойчивость однородного по пространству, в данном случае по координате r , стационарного состояния в этой системе. Для этого зададим малые возмущения, являющиеся функциями не только времени, но и пространственной координаты, т. е. вблизи x и y будем искать решения в виде

$$\begin{aligned} x_1(r, t) &= p_k e^{p t} \cos \pi k r / L; \\ y_1(r, t) &= p_k e^{p t} \cos \pi k r / L. \end{aligned} \quad (\text{II.4.12})$$

Здесь возмущения вдоль реактора выбраны изменяющимися по закону косинуса, чтобы выполнить условия непроницаемости на торцах трубки; $k = \pi / \lambda$ — волновое число; $\lambda = l / n$ — длина волны, определяющая характер неоднородностей или «изрезанности» пространства вдоль координаты r ; n —

число узлов. При $n=0$ и $\lambda \rightarrow \infty$ среда практически пространственно однородна. Дисперсионное уравнение для определения показателя p имеет вид

$$p^2 + (1 + A^2 - B + a + b)p + A^2(1 + a) + (1 - B)b + ab = 0,$$

где $a = \pi^2 D_x / \lambda^2$; $b = \pi^2 D_y / \lambda^2$.

Пространственно однородное решение устойчиво, если $B' > B$, $B'' > B$, где

$$B'(\lambda) = 1 + A^2 + a + b; \quad B''(\lambda) = (A^2 + b)(1 + a)/b.$$

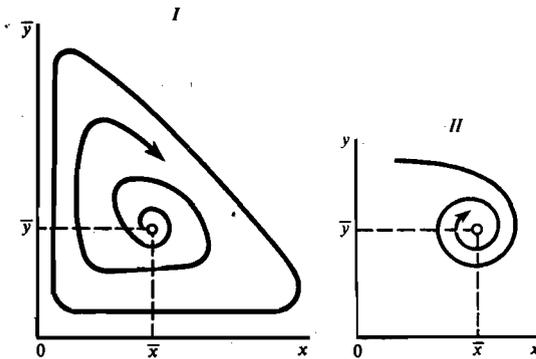


Рис. 11.12.

Фазовые портреты точечной системы «брюсселятор». I—при $B > (1 + A^2)$; II—при $B < (1 + A^2)$

Исследование типа устойчивости особой точки (II.4.11) показало, что она представляет собой устойчивый фокус при $B < 1 + A^2$ (II) и неустойчивый фокус при $B > 1 + A^2$ (I). В этом случае в точечной системе имеется устойчивый предельный цикл, т. е. точечная система является автоколебательной

В том случае, когда характеристическое уравнение имеет два действительных корня, один из которых больше нуля, а второй — меньше нуля, в системе появляется неустойчивость седлового типа (так называемая неустойчивость Тьюринга), которая приводит к развитию возмущений в пространственно однородной системе и установлению в ней пространственно неоднородных стационарных режимов. Смена характера устойчивости происходит при $B' > B$, $B'' = B$. Найдем критические значения λ_c , для которых $B'(\lambda)$ и $B''(\lambda)$ минимальны. $B'(\lambda) = 1 + A^2$ при $\lambda \rightarrow \infty$ ($k=0$). Минимум $B''(\lambda)$ достигается при $\lambda_c^2 = (1/A) \sqrt{D_x D_y}$. Это минимальное значение B'' , при котором наступает бифуркация устойчивости стационарного решения и возникает седло, равно

$$B''_{\min} = [1 + A(D_x/D_y)^{1/2}]^2.$$

Очевидно, при различных значениях волнового числа $k = \pi/\lambda$ неустойчивость в системе наступит при разных значениях B . Область волновых чисел $k = \pi/\lambda$, определяющая существование седла, задается равенством

$$k_{1,2} = \left(\frac{\pi}{\lambda_{1,2}} \right)^2 = \frac{1}{2D_x D_y} [(B-1)D_y - D_x A^2] \pm \sqrt{[(B-1)D_y - D_x A^2]^2 - 4A^2 D_x D_y},$$

В этой области значений волнового числа возможны периодические в пространстве и не зависящие от времени решения, соответствующие появлению диссипативных структур. Для возникновения диссипативных структур необходимо, чтобы коэффициенты D_x и D_y были существенно различны, а параметры A и B не слишком далеки от своих бифуркационных значений. Если скорости диффузии очень велики, то неустойчивость возникает при больших $\lambda_c^2 = (1/A) (D_x D_y)^{1/2}$, так что практически система остается однородной.

Если в точечной системе брюсселятора возмущения нарастают колебательно и рост амплитуды этих колебаний ограничивается предельным циклом, то распределенная система имеет неустойчивость колебательного типа. В этом

случае рост возмущений в распределенной системе (II.4.10) может также привести к устойчивому во времени и неоднородному по пространству распределению концентраций веществ x и y . Как и в случае неустойчивости седлового типа, рост возмущений ограничивают диссипативные процессы в системе, которые описываются нелинейными членами в уравнениях химических реакций (отсюда название — диссипативные структуры). Кроме того, в такой системе могут возникнуть автоволновые процессы типа стоячей и бегущей волны.

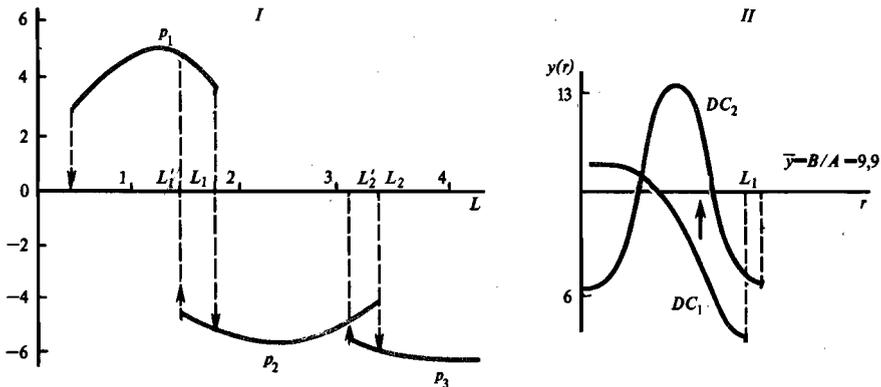


Рис. II.13.

Гистерезисные переходы между диссипативными структурами с разными формами при изменении длины системы (L) (по Ю. М. Романовскому, Н. В. Степановой, Д. С. Чернавскому, 1975):

I — зависимость амплитуд диссипативных структур (P_k , $k=1, 2, 3$) от длины системы (L);

II — гистерезисный переход от DC_1 к DC_2 при достижении критической длины L_1 (рассчитано на ЭВМ при значениях коэффициентов в системе уравнений $A=10$, $B=99$, $D_x=0,75$; $D_y=1$)

Переход от DC_1 к DC_2 происходит при $L_1=1,5$. Обратный переход от DC_2 к DC_1 может произойти только при значениях $L'_1 < L_1$. Такое же явление гистерезиса имеет место при переходе от DC_2 к DC_3 в точках L_2 при увеличении длины реактора и L'_R при ее уменьшении

При непрерывном изменении параметров одни диссипативные структуры сменяют другие. Пусть, например, все коэффициенты системы неизменны, а варьируется длина реактора L . В брюсселяторе при определенных фиксированных значениях остальных параметров первая диссипативная структура (DC_1) существует в пределах $L=0,5 \div 1,7$; вторая (DC_2) — в пределах $L=1,2 \div 3,6$; третья (DC_3) — в пределах $L=3,0 \div 4,0$ и т. д. На рис. II.13 показан переход от одной диссипативной структуры к другой, который происходит гистерезисным способом. Таким образом, одномерная трубка, в которой идет реакция, является распределенным триггером со многими устойчивыми состояниями — формами диссипативных структур.

В принципе с помощью таких триггерных структур можно моделировать процесс деления живых клеток. Если рост клетки выражается в увеличении ее длины, то при определенной длине клетка создается предпосылка деления ее на две части, т. е. в скрытой форме в ней происходит образование новой диссипативной структуры. Если же процесс переключения триггера произошел, то обратный переход благодаря гистерезису уже практически невозможен.

Как было показано выше, процессы самоорганизации в активных средах сводятся не только к образованию диссипативных структур. В них могут

возникать разнообразные автоволновые процессы: источники спонтанных волн — «ведущие центры», спиральные волны — ревербераторы, квазистохастические волны и другие явления.

Наглядно волновые процессы можно наблюдать в ходе реакции Белоусова—Жаботинского в двумерных реакторах — плоских неглубоких сосудах. Это окислительно-восстановительные реакции с участием броммалоновой кислоты, катализатором здесь служат ионы церия или марганца. Изменение валентности этих ионов приводит к локальным изменениям окраски раствора в реакторе. Механизмы возникновения и развития автоволновых реакций описываются уравнениями, подобными (II.4.10). В этом смысле брюсселятор является «базовой» моделью, объясняющей основные качественные особенности проходящих в системе процессов, подобно тому, как модель Вольтерра является базовой для математической экологии.

Изучение принципов самоорганизации (синергетические механизмы на простейших моделях) имеет принципиальное научное и прикладное значение. Развитие теории автоволновых процессов необходимо для понимания таких кардинальных явлений в живом организме, как процессы дифференцировки тканей и морфогенеза, а также нервная проводимость сердца.

На модельных системах с двумя реагирующими и диффундирующими компонентами, подобных брюсселятору, можно решать многие принципиальные вопросы, относящиеся к самоорганизации в системах с химическими взаимодействиями и диффузией. Однако многообразии химических механизмов не охватывается такими системами, реальные химические взаимодействия в клетках, как правило, много сложнее, чем в брюсселяторе.

Анализ показывает, что в области порога самоорганизации особенности молекулярных механизмов не оказывают влияния на тип симметрии диссипативных структур. Этот вывод следует из универсальности уравнения Гинзбурга—Ландау (II.4.8). Возникновение макроскопической упорядоченности по механизму тьюринговской неустойчивости предполагает появление выделенной медленной степени свободы. Таковой является амплитуда критической гармоники $U \exp(ik_{кр} r)$. Рассмотрим произвольную систему химически взаимодействующих компонентов $\{c_i\}_{i=1, \dots, N}$ вблизи «порога» самоорганизации. Независимо от числа этих компонентов и механизмов реакций между ними после некоторого, относительно короткого, промежутка времени распределение концентраций всех реагентов в пространстве и их эволюция во времени выражаются для всех i как

$$c_i \sim U(r, t) \cos k_{кр} r.$$

При этом амплитуда данного распределения $U(r, t)$ для всех компонентов реакций подчинена уравнению Гинзбурга—Ландау.

Заметим, что при переходе по известным процедурам от исходного описания химической системы в терминах концентраций реагентов c_i к переменной макроскопического описания $U(r, t)$ теряется часть информации о системе. Действительно, в уравнении (II.4.8) содержится лишь два параметра μ и α , тогда как в исходной системе их могло быть намного больше. Такое описание динамики становления макроскопической упорядоченности не позволяет точно предсказывать исходную «точку» самоорганизации в конкретных реакциях. В сложных реальных системах соответствующие данные могут быть получены из эксперимента, либо путем громоздких расчетов. Располагая ею, можно судить о крупномасштабной структуре формирующегося пространственного порядка и о ходе процесса формирования структуры во времени.

Кинетика ферментативных процессов



§ 1. Простейшие ферментативные реакции

Подавляющее большинство важнейших биологических процессов протекает с участием ферментов, химические свойства которых рассматривают в курсах по биохимии. Ферменты играют ключевую роль в клеточном метаболизме, определяя не только пути превращения веществ, но и скорости образования продуктов реакций. Физические аспекты и механизмы ферментативного катализа подробно рассмотрены в гл. XIV, здесь же будут описаны кинетические свойства ферментативных реакций, которые определяют характер динамического поведения метаболических процессов. Характер ферментативных процессов допускает феноменологическое описание их кинетики с помощью систем дифференциальных уравнений, переменными в которых выступают концентрации взаимодействующих веществ: субстратов, продуктов, ферментов. При этом достаточно использовать общие биохимические представления о последовательности событий в ферментативной реакции, не вдаваясь в физические детали механизмов, т. е. учитывать, что необходимым этапом ферментативного катализа является образование фермент-субстратного комплекса (комплекс Михаэлиса), а также использовать представления о регулировании ферментативных процессов ингибиторами и активаторами.

Кинетический анализ оказался эффективным при изучении разнообразных ферментативных реакций и позволил не только разработать методы количественной оценки эффективности ферментативных процессов, но и сделать определенные выводы об их механизмах и способах регулирования. При построении математических моделей ферментативных процессов широко применяют изложенные выше методы качественного изучения моделей биологических систем.

Уравнение Михаэлиса—Ментен. Наиболее простая ферментативная реакция с участием одного субстрата и образованием одного продукта выглядит следующим образом:



Здесь S — субстрат; P — продукт; E — фермент; ES — субстрат-ферментный комплекс; k_1, k_{-1} — константы прямой и обратной реакций образования фермент-субстратного комплекса; k_2 — константа скорости образования продукта. Эта реакция при малых концентрациях продукта является, как правило, необратимой. Константа эффективного распада фермент-субстратного комплекса k_2 показывает, сколько актов катализа в единицу времени может осуществлять фермент, и поэтому называется числом оборотов фермента. Запишем систему дифференциальных уравнений, отвечающую схеме реакций (III.1.1):

$$\begin{aligned} d[S]/dt &= -k_1[S][E] + k_{-1}[ES]; \\ d[E]/dt &= -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] + k_2[ES]; \\ d[ES]/dt &= k_1[S][E] - k_{-1}[ES] - k_2[ES]; \\ d[P]/dt &= k_2[ES]. \end{aligned} \quad (\text{III.1.2})$$

Сложив второе и третье уравнения системы (III.1.2), получим условие сохранения общего количества фермента в системе:

$$\frac{d}{dt} ([E] + [ES]) = 0, \text{ или } [E] + [ES] = [E_0] = \text{const.} \quad (\text{III.1.3})$$

В замкнутой системе сохраняется также сумма масс субстрата и продукта $[S] + [P] = \text{const.}$ Как видно из (III.1.2), $d[E]/dt = -d[ES]/dt$.

Уравнение системы (III.1.2), описывающее изменение продукта, является независимым и может быть заменено алгебраическим уравнением (III.1.3). Тогда вместо четырех уравнений (III.1.2) можно решать систему всего из двух дифференциальных уравнений для переменных $[S]$ и $[ES]$. Посмотрим, насколько различаются эти переменные по скоростям своих изменений.

Введем безразмерные величины:

$$x = [ES]/[E_0]; \quad y = [S]/[S_0]; \quad \bar{z} = [P]/[S_0]; \quad \tau = k_2[E_0]t/[S_0]; \quad k_{-1}/k_2 = n.$$

Разделив правую и левую части второго уравнения на величину $k_1[S_0]/k_2 = m$, получим

$$dy/d\tau = nx - my(1-x); \quad \frac{[E_0]}{[S_0]} \frac{dx}{d\tau} = my(1-x) - (n+1)x. \quad (\text{III.1.4})$$

В реальных биохимических процессах концентрация субстрата во много раз превышает концентрацию свободного фермента (обычно $[E_0] = 10^{-6} \text{M}$, а $[S_0] = 10^{-2} \text{M}$). Таким образом, $[E_0]/[S_0] = 10^{-4}$. Как показано выше (см. § 4 гл. II), наличие малого множителя $[E_0]/[S_0]$ перед производной $dx/d\tau$ в (III.1.4) означает, что соответствующая переменная x является быстрой по сравнению с переменной y .

Обсудим физический смысл этого результата. Характерное время изменения субстрата, очевидно, равно $\tau_s = [S_0]/v$, где v — скорость ферментативной реакции. Максимальное значение v составляет $\mu_0 - k_2[E_0]$. Следовательно, минимальное значение τ_s равно $\tau_s^{\text{min}} = [S_0]/k_2[E_0]$.

Характерное время оборота фермента определяется в основном реакцией распада $[ES]$ и константой k_2 ($k_2 \gg k_1$). Оно равно $\tau_E = 1/k_2$. Отсюда $\tau_s \gg \tau_E$, т. е. переменная S меняется намного медленнее, чем $[ES]$, а это означает, что скорость изменения субстрата мала по сравнению со скоростью изменения фермент-субстратного комплекса. Следовательно, при рассмотрении поведения системы на достаточно больших отрезках времени концентрацию фермент-субстратного комплекса $[ES]$ во втором уравнении (III.1.4) можно полагать квазистационарной, а само второе уравнение этой системы может быть заменено алгебраическим:

$$my(1-\bar{x}) - (n+1)\bar{x} = 0.$$

Отсюда

$$\bar{x} = \frac{y}{y + (n+1)/m}, \text{ или } \bar{x} = \frac{y}{y + (k_{-1} + k_2)/[S_0]k_1}.$$

Величина $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$ является характеристической константой в химии ферментов и носит название константы Михаэлиса.

Так как k_{-1} и k_2 — константы первого порядка, а k_1 — константа второго порядка, K_m имеет размерность концентрации $t^{-1}/(c^{-1}t^{-1}) = [c]$. Если перейти к величинам, имеющим размерность, получим, что квазистационарное значение концентрации $[ES]$ фермент-субстратного комплекса $[ES] = E_0 S / (K_s + S)$.

Скорость реакции (скорость образования продукта, равная скорости убыли субстрата) выражается из четвертого уравнения системы (III.1.2):

$$\mu = -\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = \frac{k_2 E_0 S}{K_m + S} = \frac{\mu_0 S}{K_m + S}. \quad (\text{III.1.5})$$

Уравнение (III.1.5) называется уравнением Михаэлиса. Из уравнения видно, что при увеличении концентрации субстрата S от 0 до ∞ скорость реакции (тангенс угла наклона начальных участков кинетических кривых $S(t)$) возрастает от нуля до своего максимального значения $v = k_2 E_0$. Таким образом, ферментативные процессы — это процессы с насыщением. На рис. III.1 изображена зависимость скорости реакции от концентрации субстрата (гипербола Михаэлиса).

Из уравнения (III.1.5) также видно, что при $K_m = S$ скорость реакции равна $v/2$. Таким образом, константа Михаэлиса по физическому смыслу и числовому значению равна концентрации субстрата, при которой стационарная скорость реакции достигает половины своего максимального значения, или, другими словами, когда половина молекул фермента находится в состоянии комплекса с субстратом.

В живых системах константы Михаэлиса соответствующих ферментативных процессов и концентрации реагентов обычно величины одного порядка. Величина K_m сильно варьирует (от 1 до 10^{-8} М). Например, для лактатдегидрогеназы пировиноградной кислоты $K_m = 3,5 \cdot 10^{-5}$ М, для инвертазы сахарозы $K_m = 2,8 \cdot 10^{-2}$ М, для мальтазы-мальтозы $K_m = 2,1 \cdot 10^{-1}$ М.

Роль ингибиторов. В присутствии некоторых веществ, называемых ингибиторами (I), ферментативная реакция может замедляться. Так, если ингибитор способен соединяться с ферментом (E) в его активном центре по схеме $E + I \rightleftharpoons [EI]$, то говорят о реакции в присутствии конкурентного ингибитора, заменяющего субстрат. В этом случае формула (III.1.5) для скорости реакции усложняется:

$$\mu = \frac{\mu_0 S}{K_m + S + k_i I}.$$

Если фермент в состоянии принять как молекулу ингибитора, так и молекулу субстрата с образованием комплекса, то говорят об аллостерическом (неконкурентном) ингибировании. При этом скорость образования продукта запишется в виде

$$\mu = \frac{\mu'_0 S}{(K'_m + S)(1 + k'_i I)}.$$

Заметим, что при избытке субстрата, когда скорость реакции перестает зависеть от его концентрации, обе формулы приводят к единой качественной зависимости скорости образования продукта от концентрации ингибитора:

$$\mu = \mu_i / (1 + k_i I).$$

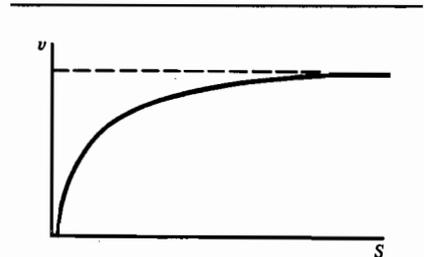


Рис. III.1. Стационарная скорость простейшей ферментативной реакции как функция концентрации субстрата

Дальнейший анализ аллостерических свойств ферментов привел к выводу, что они могут обладать значительно большим, чем один, числом каталитических центров. Это означает, что к молекуле фермента может присоединиться n молекул субстрата ($n > 1$). Изменив стехиометрию реакции фермента с субстратом, получаем цепочку:



Скорость наработки продукта в этой реакции будет равна $\mu = \mu_n S^n / (1 + k_n S^n)$. Существенно, что для аллостерических ферментов со стехиометрическим коэффициентом n , отличным от единицы ($n > 1$), характер зависимости $\mu(S)$ меняется. Кривая приобретает сигмоидный характер с характерной точкой перегиба (рис. III.2, кривая 2).

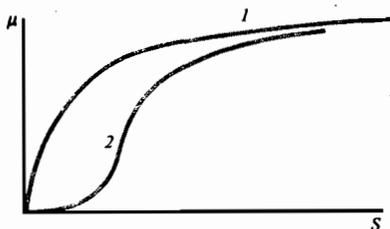


Рис. III.2.
Два варианта зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата:
1 — $n=1$, 2 — $n > 1$

Аналогичная особенность возникает при учете ингибирующего воздействия избытка субстрата. При этом скорость определяется формулой

$$\mu = \frac{\mu_{ni}}{1 + k_{ni} I^n}.$$

Наряду с ингибиторами имеются вещества, увеличивающие интенсивность работы фермента и называемые активаторами (A). Образуя тройной комплекс с субстратом и ферментом, они увеличивают скорость образования продукта:

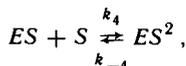
$$\mu = \frac{\mu_A S}{K_m + S} \frac{A}{k_A + A}.$$

Нетрудно видеть, что качественно влияние активаторов на скорость ферментативной реакции описывается аналогично влиянию концентрации субстрата.

До сих пор предполагалось, что при больших концентрациях субстрата скорость ферментативной реакции не зависит от этой концентрации. Однако существуют ферментативные реакции, имеющие характерную зависимость стационарной скорости от концентрации субстрата в виде кривой с максимумом. Подобного рода зависимость объясняется так называемым субстратным торможением (ингибирование), которое является следствием образования (наряду с активным) неактивного комплекса субстрата с ферментом. Соотношение вероятностей образования активного и неактивного комплексов меняется с изменением концентрации субстрата. При больших концентрациях субстрата преобладает вероятность образования неактивных комплексов ES^2 , которые включают одновременно две молекулы субстрата. Как будет показано дальше, именно субстратное угнетение ферментов — наиболее типичная причина нелинейности биохимических систем. Наличие такого типа нелинейности обуславливает важные, с точки зрения механизмов регулирования, свойства ферментативных систем: множественность стационарных состояний, колебательный характер изменения переменных.

Стационарная скорость реакции в системе, где помимо активного комплекса ES образуется неактивный комплекс ES^2 :





выражается в виде

$$v = \frac{k_2[E_0][S]}{K_m + [S] + [S]^2 / K_s}, \quad (\text{III.1.7})$$

где $K_s = k_4/k_{-4}$.

Рассмотрим открытую ферментативную систему с субстратным угнетением и постоянной скоростью притока субстрата в сферу реакции. Если, кроме того, имеет место отток продукта из сферы реакции, схема (III.1.6) дополняется еще двумя реакциями:



Система кинетических уравнений, соответствующая схемам (III.1.6) и (III.1.8), имеет вид

$$\begin{aligned} d[S]/dt &= k_1[S_0] - k_2[S][E] + k_{-2}[SE] - k_4[SE][S] + k_{-4}[S^2E]; \\ d[ES]/dt &= k_2[S][E] - k_{-2}[SE] - k_3[SE] - k_4[SE][S] + k_{-4}[S^2E]; \\ d[E]/dt &= -k_2[S][E] + k_{-2}[SE] + k_3[SE]; \\ d[S^2E]/dt &= k_4[SE][S] - k_{-4}[S^2E]; \\ d[P]/dt &= k_3[SE] - k_5[P]; \quad [E] + [SE] + [S^2E] = E_0. \end{aligned} \quad (\text{III.1.9})$$

Система (III.1.9) может быть упрощена с учетом того, что концентрация фермента E_0 существенно меньше концентрации субстрата, подобно тому, как это делали выше для простой ферментативной реакции.

Замена дифференциальных уравнений для скорости изменения концентраций фермент-субстратных комплексов на алгебраические и подстановка соответствующих переменных в уравнение для изменения концентрации субстрата приводят к следующему уравнению ферментативной реакции с субстратным угнетением:

$$\frac{d\sigma}{dt} = \alpha - \frac{(c+1)a\sigma}{1+a\sigma+\beta(a\sigma)^2} = f(\alpha, \sigma). \quad (\text{III.1.10})$$

Здесь $\sigma = [S]/K_m$ — безразмерная концентрация субстрата; $\tau = k_3[E_0]t/K_m$ — безразмерное время; $\alpha = k_1[S_0]/k_3[E_0]$; $c = k_{-2}/k_3$; $a = k_2[S_0]/k_3$; $\beta = (k_3/k_2)(k_4/k_{-4})$.

От выражения (III.1.7) уравнение (III.1.10) отличается свободным членом α , характеризующим скорость поступления субстрата в сферу реакции. Стационарные точки уравнения (III.1.10) находят из условия $d\sigma/d\tau = 0$ или

$$\frac{(c+1)a\sigma}{1+a\sigma+\beta(a\sigma)^2} = \alpha. \quad (\text{III.1.11})$$

Для определения числа и характера особых точек этого уравнения удобно использовать графическое представление зависимости скорости притока α и расхода субстрата в реакции v от величины σ . Решениям уравнения (III.1.11) будут соответствовать точки пересечения графика функции

$$v(\sigma) = \frac{(c+1)a\sigma}{1+a\sigma+\beta(a\sigma)^2} \quad (\text{III.1.12})$$

с прямой постоянного источника α .

Как уже было показано, функция v (σ) графически выражается кривой с максимумом (рис. III.3).

Скорость притока субстрата в сферу реакции можно рассматривать как параметр, наиболее удобный для управления ферментативной системой, в уравнении (III.1.10) ему соответствует величина α . Зависимость стационарного значения σ от значения скорости притока субстрата в систему α представляет собой бифуркационную диаграмму (рис. III.4).

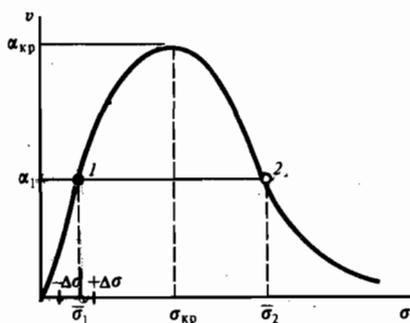


Рис. III.3. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

Различным значениям скорости притока субстрата σ соответствует семейство прямых, параллельных оси абсцисс. График функции $\chi(\sigma)$ может иметь две или одну точку пересечения с прямой α или не иметь ни одной. Это соответствует наличию двух или одного стационарных состояний в системе или отсутствию таковых. При наличии двух стационарных состояний в системе особая точка σ_1 является устойчивой, а σ_2 — неустойчивой. В этом нетрудно убедиться путем следующих рассуждений. Пусть в результате некоторого отклонения $\Delta\sigma < 0$ от стационарной точки σ_1 величина σ стала меньше стационарного значения. В области $\sigma < \sigma_1$ скорость притока субстрата больше скорости его оттока ($\alpha > v$) и, следовательно, переменная σ будет расти, приближаясь к σ_1 . Если же отклонение от стационарной точки $\Delta\sigma > 0$, скорость притока субстрата больше его оттока, и σ будет уменьшаться, вновь приближаясь к стационарному значению σ_1 . Таким образом, при любом отклонении от стационарного состояния σ_1 система будет в него возвращаться и, следовательно, состояние σ_1 устойчиво. Аналогичные рассуждения в отношении стационарной точки σ_2 приводят к выводу, что она имеет неустойчивый характер. Этот вывод легко сделать, определив знак производной по σ правой части функции $f(\alpha, \sigma)$ выражения (III.1.10), который отрицателен для $\sigma < \sigma_{кр}$ и положителен для $\sigma > \sigma_{кр}$ (см. исследование на устойчивость стационарного состояния для одного уравнения — § 2, гл. I)

рость расхода субстрата больше его притока и σ будет уменьшаться, вновь приближаясь к стационарному значению σ_1 . Таким образом, при любом отклонении от стационарного состояния σ_1 система будет в него возвращаться и, следовательно, состояние σ_1 устойчиво. Аналогичные рассуждения в отношении стационарной точки σ_2 приводят к выводу, что она имеет неустойчивый характер. Этот вывод легко сделать, определив знак производной по σ правой части функции $f(\alpha, \sigma)$ выражения (III.1.10), который отрицателен для $\sigma < \sigma_{кр}$ и положителен для $\sigma > \sigma_{кр}$ (см. исследование на устойчивость стационарного состояния для одного уравнения — § 2, гл. I)

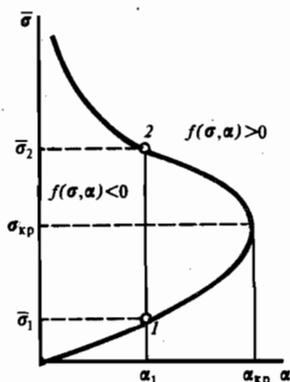


Рис. III.4. Бифуркационная диаграмма системы с субстратным угнетением

Параметрическая кривая ферментативной системы $\sigma(\alpha)$ состоит из двух ветвей (как на рис. I.2 для системы (I.2.4)). Точки, лежащие на нижней ветви и кривой, устойчивые, на верхней ветви — неустойчивые. Значение параметра $\alpha_{кр}$ является бифуркационным, ему соответствует единственное стационарное состояние на стыке верхней и нижней ветвей. При значениях $\alpha > \alpha_{кр}$ стационарное состояние недостижимо, при этом в системе будет происходить неограниченное накопление субстрата

§ 2. Множественность стационарных состояний в ферментативных системах

В тех случаях, когда функция притока субстрата в сферу реакции не является постоянной, а носит более сложный характер, возможны и более сложные типы поведения ферментативной системы. Например, в открытой ферментативной системе с субстратным угнетением и обратимой реакцией притока субстрата



возможно наличие двух устойчивых стационарных состояний, т. е. такая система является триггерной (см. § 1 гл. II).

В отличие от рассмотренной системы (III.1.10) безразмерная скорость изменения концентрации субстрата в (III.2.1) имеет вид

$$\frac{d\sigma}{d\tau} = \alpha - \beta\sigma - \frac{\sigma}{1 + \sigma + \gamma\sigma^2} = f(\alpha, \sigma) \quad (III.2.2)$$

Здесь $\sigma = [S]/K_m$; $K_m = (k_{-2} + k_3)/k_2$; $\alpha = k_1[S_0]/(k_3E_0)$; $\beta = k_{-1}K_m/(k_3E_0)$; $\gamma = k_mk_4/k_{-4}$.

Рис. III.5. Графическое определение числа стационарных состояний в системе с субстратным угнетением и обратимой реакцией притока субстрата

Различным значениям α соответствует семейство параллельных прямых α_i . При некоторых значениях скорости притока субстрата α уравнение (III.2.3) имеет три корня, что соответствует трем различным состояниям рассматриваемой системы

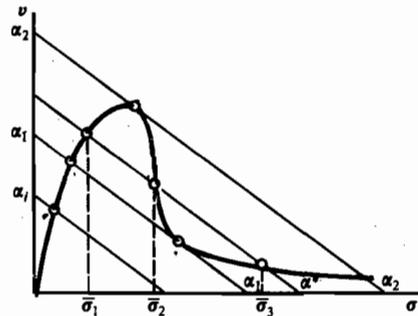
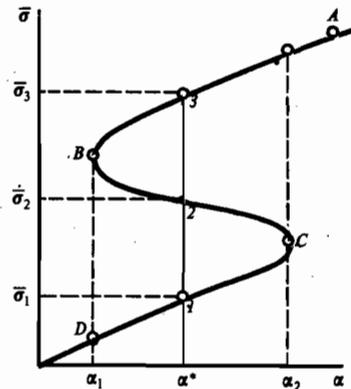


Рис. III.6. Кривая стационарных состояний системы с субстратным угнетением и обратимой реакцией притока субстрата

Система характеризуется S-образной кривой стационарных состояний. При изменении управляющего параметра в интервале $\alpha_1 \leq \alpha \leq \alpha_2$ каждому значению отвечают три различных стационарных состояния системы. В соответствии со знаком производной $f'_\sigma(\alpha, \sigma)$ функции, стоящей в правой части уравнения (III.2.2), все точки, лежащие на нижней DC и верхней BA ветвях, относятся к устойчивым ($f'_\sigma < 0$), а лежащие на промежуточном участке кривой BC — к неустойчивым стационарным состояниям ($f'_\sigma > 0$)



Воспользуемся, как и прежде, графическим представлением и найдем стационарные решения уравнения (III.2.2) из равенства

$$\alpha - \beta\sigma - \frac{\sigma}{1 + \sigma + \gamma\sigma^2} = 0 \quad (III.2.3)$$

как точки пересечения графика функции $v(\sigma)$ расхода субстрата в реакции и прямой источника $v_i = \alpha - \beta\sigma$ (рис. III.5). Эти же точки можно найти, построив зависимость σ стационарных решений уравнения (III.3) от значения параметра α , характеризующего скорость притока субстрата в систему (рис. III.6).

При всех значениях управляющего параметра в интервале $\alpha_1 \leq \alpha \leq \alpha_2$, где α_1, α_2 соответствуют бифуркационным значениям параметра, рассматриваемая система может функционировать в одном из двух устойчивых стационарных состояний, т. е. обладает триггерными свойствами. Это означает, что при изменении управляющего параметра система может переключаться из

одного устойчивого режима в другой. Поясним с помощью графика, как это происходит (рис. III.6).

Предположим, что исходному состоянию системы соответствует стационарная точка A , лежащая на верхней ветви кривой $\bar{\sigma}(\alpha)$. Будем понижать скорость притока субстрата α , при этом система начнет «перемещаться» влево вдоль верхней устойчивой ветви стационарных состояний. При достижении бифуркационного значения параметра α_1 система покинет неустойчивую точку B и, совершив скачкообразный переход $B \rightarrow D$, попадет на нижнюю ветвь устойчивых стационарных состояний. Увеличивая снова значения управляющего параметра от α_1 до α_2 , можно перевести систему вдоль устойчивой ветви DC до бифуркационной точки C , после достижения которой система самопроизвольно вернется в исходное состояние A . При обратимом изменении управляющего параметра α (уменьшении, а затем увеличении до прежних значений) осуществится замкнутый цикл состояний рассматриваемой системы.

Какое из двух возможных устойчивых состояний реализуется в системе и какое направление имеют скачкообразные переходы, зависит от того, происходит увеличение или уменьшение параметра. Указанное свойство системы — совершать переход из одного состояния в другое различными путями в зависимости от направления изменения значений параметра — называется гистерезисом (рис. III.7).

Множественность стационарных состояний и связанные с ней гистерезисные и триггерные явления играют важную роль как средства регулирования биологических систем. Действительно, при наличии гистерезисных свойств поведение системы в ответ на изменение параметров, отражающее изменение внешних условий, будет зависеть от ее предыстории. Таким образом, свойственный ферментативным системам гистерезис может являться основой динамической памяти, присущей всем биологическим объектам.

Триггерные свойства ферментативных систем играют решающую роль в регулировании внутриклеточных процессов метаболизма, а также в процессах клеточной дифференциации, когда при делении появляются дочерние клетки, качественно отличные от клеток предшественников. В настоящее время хорошо известны также триггерные свойства ферментативных систем, осуществляющих транспортную функцию. В частности, такие явления были обнаружены при изучении переноса растворов через пористые мембраны.

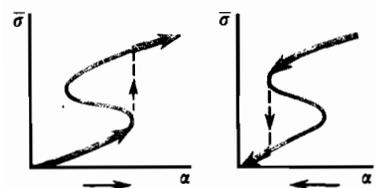


Рис. III.7.

Явление гистерезиса в системе с субстратным угнетением и обратной реакцией притока субстрата

Система мембранного переноса, сопря-

женная с химической реакцией, в которой участвует транспортируемое соединение, обладает триггерными свойствами.

Предположим, что химический процесс катализируется ферментом, свойства которого, в свою очередь, зависят от концентрации субстрата (транспортируемое вещество) или продукта реакции. Такая зависимость может быть основана на изменении конформационного состояния фермента при некоторых критических концентрациях названных соединений. В этих условиях вместе с конформационным состоянием фермента будут меняться его активность и, следовательно, скорость химического процесса.

Для скорости ферментативной реакции типична S-образная зависимость от концентрации субстрата (рис. III.8).

Величина концентрации S , характер ее изменения во времени и активность фермента определяются соотношением скоростей притока субстрата извне через мембрану и его расходования в химической реакции. Пусть скорость

Рис. III.8.
S-образная зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

С увеличением концентрации субстрата скорость реакции возрастает (участок 1), однако активность фермента при этом остается постоянной. При достижении критической концентрации $[S_2]$ конформационное состояние фермента скачкообразно (в результате конформационного перехода) изменяется и его активность повышается. Теперь при повышенной активности фермента зависимость скорости реакции от концентрации субстрата определяется участком 2 кривой

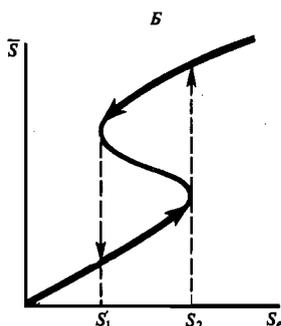
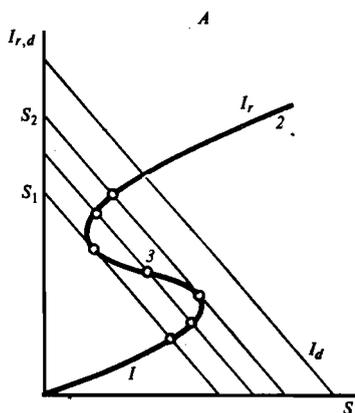
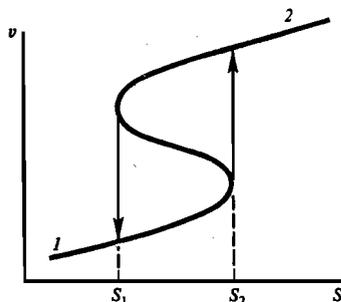


Рис. III.9.

Графическое определение стационарных состояний в системе мембранного переноса, сопряженной с ферментативной реакцией:

А — зависимость скорости химической реакции (I_r) и скорости диффузии субстрата (I_d) от концентрации субстрата S ; Б — кривая стационарных концентраций субстрата в сфере реакции в зависимости от значений управляющего параметра $[S_c]$

А — все точки, лежащие на нижней (1) и верхней (2) ветвях кривой $I_r(S)$, относятся к устойчивым, а лежащие на промежуточной ветви (3) — к неустойчивым стационарным состояниям. Значения S_1 и S_2 для величины S_c соответствуют точкам предельной устойчивости двух конформационных состояний фермента.

Б — по ходу обратного изменения параметра в сторону меньших, а затем больших значений (и обратно) система описывает замкнутый гистерезисный цикл стационарных состояний, совершая скачкообразные триггерные переходы при достижении критических концентраций субстрата S_1 и S_2 , соответствующих точкам предельной устойчивости конформационных состояний фермента

химической реакции I_r потребления субстрата S описывается уравнением

$$I_r = -\frac{d[S]}{dt} = -k_r(S)[S],$$

где $E(S)$ — активность фермента как функция концентрации $[S]$; k_r — константа скорости рассматриваемой реакции.

В соответствии со сделанным выше предположением о свойствах фермента зависимость $I_r(S)$ графически выражается кривой, показанной на рис. III.9, А. Допустим, что скорость диффузии субстрата извне через мембрану в сферу реакции описывается уравнением первого порядка

$$I_d = d[S]/dt = k_d([S_e] - [S]), \quad (\text{III.2.4})$$

где $[S_e] = \text{const}$ — концентрация субстрата во внешней среде; k_d — константа скорости диффузии. При одних и тех же значениях k_d , но разных концентрациях $[S_e]$ зависимости $I_d(S)$ будет соответствовать семейство параллельных прямых I_d .

Общее изменение $[S]$ в результате двух процессов описывается уравнением

$$d[S]/dt = f(S) = I_d(S) + I_r(S) = k_d([S_e] - [S]) - k_r E(S)[S]. \quad (\text{III.2.5})$$

В стационарном режиме скорости химической реакции и транспорта субстрата через мембрану равны между собой. Найдем стационарные решения уравнения (III.2.5) как точки пересечения кривых $I_r(S)$ и $I_d(S)$, в которых выполняется равенство

$$I_r(S) = I_d(S) \quad (\text{III.2.6})$$

или

$$k_d([S_e] - [S]) = k_r E(S)[S]. \quad (\text{III.2.7})$$

При определенных значениях параметров уравнение (III.2.7) имеет три корня, что соответствует трем различным стационарным состояниям рассматриваемой системы. В зависимости от расположения стационарной точки на кривой $I_r(S)$ она может носить устойчивый или неустойчивый характер.

Считая концентрацию субстрата во внешней среде $[S_e]$ управляющим параметром, рассмотрим поведение системы в ответ на изменение этой величины (рис. III. 9, Б). Как было показано в § 4 гл. II, в том случае, когда особая точка системы расположена на неустойчивой ветви (3), такая система может совершать релаксационные колебания.

§ 3. Колебания в ферментативных системах

Нелинейность кинетики важнейших биохимических процессов обуславливает возможность существования в биологических системах наряду с триггерными режимами незатухающих периодических режимов (автоколебания), для исследования свойств которых применимы качественные методы анализа динамических систем.

Обнаружение «биологических часов» с эндогенным ритмом в одноклеточных организмах послужило убедительным доказательством того, что источником биологических ритмов является автоколебательная система биохимических реакций, локализованная внутри клетки.

Развитие термодинамики необратимых процессов показало, что колебания в химических реакциях возможны лишь вдали от термодинамического равновесия (см. гл. VI). Известно также, что для того, чтобы в химической реакции существовало неравновесное стационарное состояние, необходимо, чтобы изменение концентраций двух различных групп реагентов происходило в двух сильно различающихся масштабах времени. В ферментативных системах это условие практически всегда выполняется, так как обычно концентрация субстрата намного превышает концентрацию фермента, что, в свою очередь, обуславливает возможность существования двух сильно различающихся масштабов времени для субстрата (τ_s) и ферментсодержащих комплексов ($\tau_s \gg \tau_f$) (см. § 1 гл. III). Временная иерархия реагентов и условия приближенной стационарности для некоторых из них (например, для фермент-субстратного комплекса) могут реализоваться не только в открытых, но и

в замкнутых ферментативных системах. Однако в замкнутых системах эти условия выполняются лишь в течение некоторого ограниченного интервала времени, пока концентрация субстрата достаточно велика. Поэтому колебания, имеющие место в замкнутых ферментативных системах, всегда являются затухающими, что определяется эволюцией замкнутой системы к равновесному состоянию.

Незатухающие колебательные изменения концентраций реагентов возможны лишь в открытых ферментативных системах, где существование двух сильно различающихся масштабов времени может поддерживаться неограниченно долго за счет притока субстрата от внешнего источника и оттока продукта во внешнюю среду. В системе сопряженных полиферментативных реакций, в которых продукт одной реакции служит субстратом для следующей, масштаб времени, связанный с первым субстратом и последним продуктом, может значительно превосходить масштаб времени, характерный для промежуточных реагентов. Поэтому в таких системах особенно вероятно возникновение незатухающих колебаний концентраций компонентов:

Таким образом, необходимыми условиями возникновения в системах концентрационных колебаний являются нелинейный механизм реакций, «открытость» ферментативных систем и существенное различие характерных времен отдельных стадий процесса.

Распространенной причиной нелинейности биохимических систем является наличие обратной связи в цепи ферментативных реакций, продукт которых контролирует активность фермента по общей схеме



Характер такого влияния может быть различным: наиболее распространено продуктивное угнетение, однако могут быть случаи, когда продукт активирует фермент при всех значениях собственных концентраций или угнетает при одних и активирует при других концентрациях. Другой широко распространенный механизм регулирования биохимических систем — субстратное угнетение ферментов.

В § 2 настоящей главы было показано, что в открытых системах с субстратным угнетением реализуется множественность стационарных состояний и наблюдается явление гистерезиса. Торможение ферментов субстратами оказывает также сильное дестабилизирующее действие на системы, контролируемые механизмами обратной связи, способствуя возникновению в них неустойчивости и автоколебаний. Примером такой системы является реакция с субстратным и продуктным угнетением:



(III.3.1)

Полное описание динамики системы реакций в соответствии с законом действующих масс включает восемь нелинейных дифференциальных уравнений. Однако тот факт, что обычно концентрации фермента E на несколько порядков ниже концентраций субстрата S и продукта P , позволяет редуцировать систему уравнений и существенно упростить это описание. Для относительных концентраций медленных переменных — субстрата и продукта — получим следующую систему уравнений:

$$d\sigma/dt = v_1 - v(\sigma, \rho); \quad d\rho/dt = v(\sigma, \rho) - v_2, \quad (\text{III.3.2})$$

где σ, ρ — безразмерные концентрации субстрата и продукта соответственно; τ — безразмерное время; $v(\sigma, \rho)$ — относительная квазистационарная скорость ферментативной реакции.

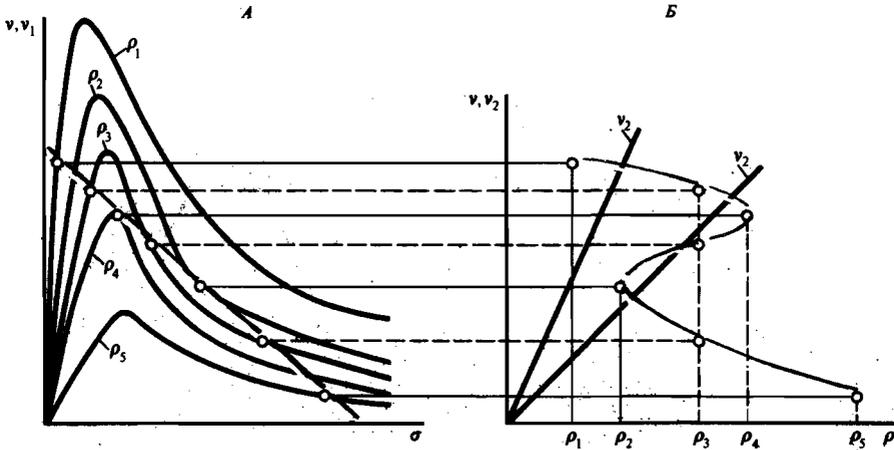


Рис. III.10.

К определению числа стационарных состояний в системе с субстратным и продуктным угнетением: А — скорость «источника» v_1 и ферментативной реакции v в зависимости от концентрации субстрата σ ; Б — скорость реакции v и стока продукта v_2 в зависимости от концентрации последнего

Функции $v_1(\sigma)$ соответствует прямая, функция $v(\sigma)$ выражается кривой с максимумом. С увеличением концентрации продукта в сфере реакции максимум кривых $v(\sigma)$ понижается и смещается вправо — в область более высоких концентраций субстрата, что обусловлено наличием продуктного угнетения. В зависимости от величины ρ (концентрация продукта) графики функций $v_1(\sigma)$ и $v(\sigma)$ могут иметь от одной до трех точек пересечения. Наличие одной точки пересечения при $\rho < \rho_2$ и $\rho > \rho_4$ означает, что таким концентрациям продукта соответствуют единственные значения скорости реакции $v(\sigma)$. Каждому значению ρ из интервала $\rho_2 < \rho < \rho_4$ соответствуют три точки пересечения графиков $v_1(\sigma)$ и $v(\sigma)$; следовательно, три различных значения $v(\rho)$. Критическим значениям концентрации продукта $\rho = \rho_2$ и $\rho = \rho_4$ отвечают по два различных значения скорости реакции $v(\rho)$. Таким образом, зависимость $v(\sigma)$ графически выражается характерной Z-образной кривой

В том случае, когда реакция притока субстрата обратима, а сток продукта — линейный, квазистационарная скорость ферментативной реакции $v(\sigma, \rho)$ определяется для некокурентного угнетения продуктом уравнением

$$v(\sigma, \rho) = \frac{\sigma}{(1 + \sigma + \alpha\sigma^2)(1 + \rho)},$$

а для конкурентного угнетения — уравнением

$$v(\sigma, \rho) = \frac{\sigma}{(1 + \sigma + \alpha\sigma^2)(1 + \sigma + \alpha\sigma^2 + \rho)},$$

При определении числа и характера устойчивости особых точек системы можно использовать графическое представление зависимостей $v_1(\sigma), v_2(\sigma), v(\sigma, \rho)$ (рис. III.10). В основе этого метода лежит необходимое условие стационарности процесса — равенство скоростей отдельных его стадий.

Найдем стационарное состояние системы (III.3.2) с помощью уравнения баланса для продукта: $dp/dt = 0$; $v(\rho) = v_2(\rho)$. Решениям этого уравнения $v = v_2$ соответствуют точки пересечения графиков $v(\rho)$ и $v_2(\rho)$, представленных на рис. III.10, Б. Видно, что кривая $v(\rho)$ может иметь от одной до трех точек пересечения с прямой стока продукта $v_2(\rho)$. Это означает, что в рассматриваемой системе возможно существование от одного до трех стационарных состояний.

К аналогичному выводу приводит рассмотрение фазовой плоскости системы σ, ρ (рис. III.11). Здесь представлено расположение на фазовой плоскости главных изоклин. Семейство пунктирных кривых 1—4 соответствует изоклине горизонтальных касательных $d\rho/d\tau=0$ при различных значениях параметра μ , характеризующего глубину продуктного угнетения. Сплошная линия соответствует главной изоклине вертикальных касательных $d\sigma/d\tau=0$. Число стационарных состояний системы и их устойчивость зависят от значения параметра μ . В случае слабого угнетения продуктом $\mu \ll 1$ в системе может реализоваться единственное стационарное состояние, расположенное на неустойчивой части характеристики $v(\rho)$. При этом относительная концентрация субстрата оказывается быстрой переменной по сравнению с концентрацией продукта и в системе возникают автоколебания, подобно тому, как это было описано (см. § 2 гл. II). Фазовый портрет системы при малой глубине продуктного угнетения изображен на рис. III.12 (ср. с рис. II.10). Кинетика изменения переменных во времени в такой системе, полученная с помощью ЭВМ, представлена на рис. III.13.

Как показано выше (см. рис. III.10), в зависимости от расположения главных изоклин $d\rho/d\tau=0$; $d\sigma/d\tau=0$ система (III.2) может иметь одно, два или три стационарных состояния. В том случае, если реализуются три стационарных состояния, одно из них будет обязательно типа «седло» и поэтому всегда неустойчиво. Два других могут иметь характер устойчивого узла или фокуса либо неустойчивого узла или фокуса. В том случае, когда два из трех стационарных состояний устойчивы, система является триггером.

При определенных значениях параметров, в частности когда скорость притока субстрата равна скорости утилизации продукта, в системе существует единственное устойчивое положение равновесия. В этом случае возникновение автоколебаний невозможно, так как необходимым условием существования предельного цикла на фазовой плоскости является наличие неустойчивых положений равновесия. Анализ корней характеристического уравнения системы и построение бифуркационной диаграммы показывают, что необходимым условием существования предельного цикла является преобладание скорости притока субстрата над скоростью утилизации продукта.

Множественность стационарных состояний, гистерезис и автоколебания — основные свойства кинетики исследованной реакции — являются прямым

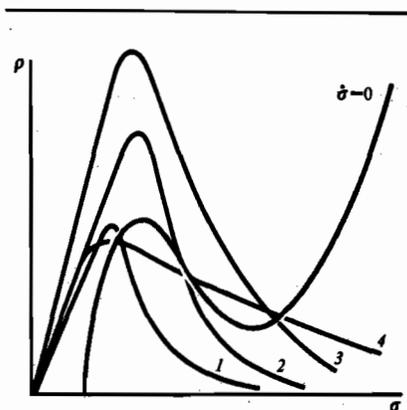


Рис. III.11. Расположение главных изоклин на фазовой плоскости системы (III.3.2) с субстратным и продуктным угнетением при ферментативной природе реакции стока продукта (по А. М. Жаботинскому, 1974):

1, 2, 3, 4 — кривые, соответствующие $\rho=0$ при различных значениях параметров системы

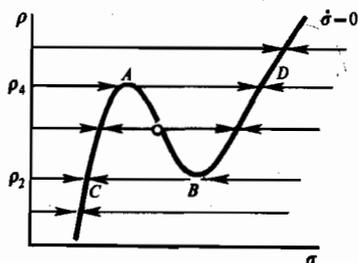


Рис. III.12. Фазовый портрет системы (III.3.2) при $\mu < 1$ (малая глубина продуктного угнетения)

следствием сильной нелинейности, обусловленной механизмами субстратного и продуктного угнетения. Поскольку комбинированное угнетение ферментов субстратами и продуктами — явление весьма распространенное, рассмотренная модель может быть использована для объяснения периодических колебаний в различных реальных биохимических процессах.

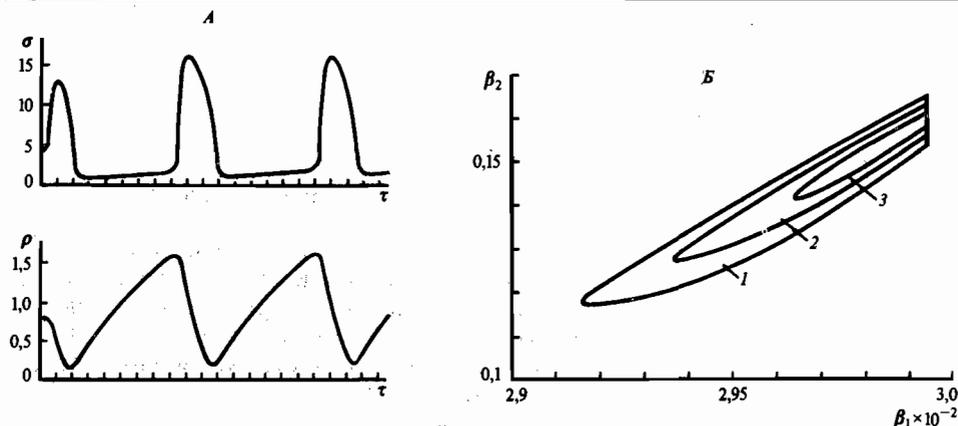


Рис. III.13.

Концентрационные автоколебания в системе (III. 3.2) с субстратным и продуктным угнетением: А — изменение концентрации субстрата σ и продукта ρ во времени; Б — границы областей существования единственного устойчивого предельного цикла в системе (III.3.2), окружающего единственную стационарную точку при различных значениях μ (μ — параметр, характеризующий глубину продуктного угнетения; выражается в безразмерных единицах); β_1 — скорость притока субстрата; β_2 — скорость утилизации продукта; 1 — $\mu=0$, 2 — $\mu=0,006$, 3 — $\mu=0,05$

Исследование условий возникновения незатухающих колебаний в системе биохимических реакций позволило сформулировать ряд требований, которым должна удовлетворять система, чтобы в ней могли возникнуть автоколебания.

Пусть имеется последовательность реакций, которую в целом можно представить в виде схемы $\xrightarrow{v_1} A \xrightarrow{v_2} \dots \xrightarrow{v_3} B \xrightarrow{v_4} \dots$. Результирующие скорости образования реагентов А и В равны соответственно $\bar{v}_A = v_1 - v_2$, $v_B = v_3 - v_4$.

Изменение концентраций веществ А и В может носить колебательный характер, если одновременно выполняются следующие условия:

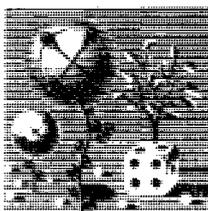
1. Один из реагентов (А, В) должен ускорять собственное образование. Это означает, что либо накопление А должно приводить к увеличению v_1 или уменьшению v_2 , либо накопление В должно приводить к увеличению v_3 или уменьшению v_4 .

2. Другой реагент должен подавлять собственное образование. Это означает, что если накопление А вызывает увеличение v_1 или снижение v_2 , то накопление В должно вызывать соответственно уменьшение v_3 или увеличение v_4 и наоборот (пример — продуктное угнетение, приводящее к уменьшению скорости образования продукта).

3. Должны существовать перекрестные взаимодействия реагентов противоположного характера. Накопление В должно вызывать увеличение v_1 или снижение v_2 , а накопление А — снижение v_3 или увеличение v_4 и наоборот (пример — субстратное угнетение, уменьшающее скорость образования продукта). Ни одно из перечисленных требований, взятых в отдельности, не является необходимым для возникновения автоколебаний.

Глава IV

Вероятностные модели в биофизике



§ 1. Стохастические модели взаимодействия

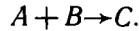
Роль случайностей в разных явлениях различна. В некоторых явлениях случайные отклонения от закономерностей настолько малы, что их можно не учитывать. Однако существуют такие явления, в которых невозможно подметить никаких закономерностей и случайность играет основную роль. Примером такого явления может служить движение малой частицы твердого вещества, взвешенной в жидкости, так называемое броуновское движение. Под действием толчков молекул жидкости частица движется совершенно беспорядочно, без всякой видимой закономерности. При движении индивидуальной частицы сама случайность является закономерностью. Однако если броуновских частиц много, их концентрация в пространстве меняется, подчиняясь определенным закономерностям, происходит диффузия таких частиц из области высоких концентраций в область более низких концентраций. Этот процесс диффузии в некотором приближении можно описывать детерминированной моделью. В детерминированных моделях значение переменных можно точно предсказать.

При исследовании многих процессов в физике, химии, биологии было замечено: в ряде случаев свойством воспроизводимости обладают не сами числовые значения какой-либо переменной, а их распределения — частоты, с которыми значение этой переменной принадлежит тому или иному интервалу на числовой прямой. В таких случаях состояние системы можно описывать распределением вероятностей, а эволюцию системы во времени — эволюцией распределений. Соответствующие модели являются стохастическими.

В биологии большинство процессов является, по существу, случайными, начиная от процессов поглощения и испускания квантов света оптически активными биомакромолекулами или процессов биохимических реакций и кончая процессами размножения организмов. Поэтому следует в моделях рассматривать распределение вероятности поглощения или испускания квантов света или распределение вероятностей рождения особей. Однако математический аппарат вероятностных распределений гораздо более громоздок и менее нагляден, чем аппарат детерминистических моделей, который был использован до сих пор. При изучении каждой конкретной системы встает вопрос о ее статистических свойствах и правомерности детерминированного описания системы. При этом важно, какие задачи ставятся в процессе исследования. Для изучения некоторых свойств системы достаточно описывать ее как детерминированную, другие свойства могут быть установлены только при вероятностном описании.

В настоящем параграфе будет рассмотрено несколько простых стохастических моделей и на их примере пояснено, к каким новым эффектам приводит вероятностное рассмотрение и когда можно ограничиться детерминированными моделями, описывающими эволюцию средних значений переменных.

Прежде всего рассмотрим вероятностную модель простейшей бимолекулярной реакции. Пусть в растворе содержатся молекулы двух видов A и B и их столкновение приводит к образованию новой молекулы C :



В начальный момент при $t=0$ было N_1 молекул вида A , N_2 — молекул вида B , а молекул вида C не было. Обозначим x_t число молекул вида C в момент t . Если на образование одной молекулы C идет одна молекула вида A и одна молекула вида B , то молекул A в момент t будет $N_1 - x_t$, а молекул вида B будет $N_2 - x_t$.

Через $p_k(t) = p(x(t) = k)$ обозначим вероятность того, что в момент t существует k молекул вида C , $k = 0, 1, 2, \dots, N_3$. Так как молекул вида C не может быть образовано больше, чем минимальное из количеств молекул A и B , то

$$N_3 = \min(N_1, N_2).$$

Пусть вероятность столкновения двух фиксированных молекул видов A и B за малый интервал времени Δt равна λ . Коэффициент λ определяется условиями, в которых происходит реакция (температура, рН, концентрация молекул и т. д.).

Предположим, что вероятность того, что за время Δt произойдет встреча между молекулами видов A и B , пропорциональна числу различных пар. Будем считать, что если к моменту t уже образовалось x_t молекул вида C , т. е. израсходовалось по x_t молекул видов A и B , то в момент t число реакционно-способных оставшихся пар равно $(N_1 - x_t)(N_2 - x_t)$.

Составим дифференциальные уравнения для функций $p_k(t)$, ($k = 0, 1, \dots, N_3$) вероятностей того, что в момент времени t будет иметься в наличии нуль, одна, две и т. д. молекул вида C .

Вероятность $p_0(t + \Delta t)$ того, что к моменту $(t + \Delta t)$ будет 0 молекул вида C , т. е. продукты реакции отсутствуют, равна вероятности того, что в момент t было 0 молекул вида C и за время $(t, t + \Delta t)$ ни одной новой молекулы не образовалось. Если первое событие, относящееся к поведению процесса до момента t , и второе, относящееся к поведению процесса после момента t , независимые, то вероятность $p_0(t + \Delta t)$ равна произведению вероятностей $p_0(t)$ и $p_0(\Delta t)$, т. е. $p_0(t + \Delta t) = p_0(t)p_0(\Delta t)$.

Мы предположили, что к моменту t ни одна из молекул типов A и B не была израсходована. Следовательно, к моменту t имеется N_1 молекул типа A и N_2 молекул типа B . Вероятность столкновения двух молекул типов A и B за время Δt равна λ . Тогда общая вероятность образования хотя бы одной молекулы типа C за время Δt равна $N_1 N_2 \lambda \Delta t$. Вероятность того, что за время Δt не образуется ни одной молекулы типа C , равна $1 - N_1 N_2 \lambda \Delta t$. Таким образом,

$$p_0(t + \Delta t) = p_0(t) (1 - \lambda N_1 N_2 \Delta t).$$

Перенесем $p_0(t)$ в левую часть равенства. Отсюда, разделив обе части на Δt и переходя к пределу при $\Delta t \rightarrow 0$, придем к дифференциальному уравнению

$$dp_0(t)/dt = -\lambda N_1 N_2 p(t), \quad (\text{IV. 1. 1})$$

к которому следует присоединить начальное условие

$$p_0(0) = 1. \quad (\text{IV. 1. 2})$$

Составим теперь уравнение для $p_k(t)$ при $k > 0$, когда появляются продукты реакции. Чтобы в момент $(t + \Delta t)$ было k молекул вида C , нужно, чтобы к моменту t было k молекул и за время $(t, t + \Delta t)$ ни одной новой молекулы типа

C не образовалось, или чтобы в момент t молекул C было $k-1$, но за время $(t, t + \Delta t)$ образовалась еще одна. Остальные варианты, когда одновременно образуется сразу несколько молекул, имеют вероятность, практически равную нулю при $\Delta t \rightarrow 0$.

Повторяя рассуждения, аналогичные проведенным при получении формулы для вероятности $p_0(t + \Delta t)$, получим соотношение

$$p_k(t + \Delta t) = [1 - \lambda(N_1 - k)(N_2 - k)\Delta t] p_k(t) + \lambda(N_1 - k + 1)(N_2 - k + 1) \times \Delta t p_{k-1}(t),$$

которое приводит к дифференциальному уравнению

$$dp_k(t)/dt = \lambda(N_1 - k + 1)(N_2 - k + 1)p_{k-1}(t) - \lambda(N_1 - k)(N_2 - k)p_k(t); \quad (k=1, 2, \dots, N_3), \quad (IV. 1. 3)$$

к которому нужно присоединить начальное условие

$$p_k(0) = 0 \text{ при } k > 0. \quad (IV. 1. 4)$$

Таким образом, получаем систему (IV.1.1), (IV.1.3) из $N_3 + 1$ уравнений. Эта система имеет простую структуру. Первое уравнение содержит только неизвестную функцию $p_0(t)$, второе — только $p_1(t)$ и $p_0(t)$, k -е — только $p_k(t)$ и $p_{k-1}(t)$. Это так называемая система зацепляющихся уравнений; можно получить аналитическое решение этой системы. Решение линейного дифференциального уравнения (IV. 1. 1) с начальным условием (IV. 1. 2) дает

$$p_0(t) = e^{-\lambda N_1 N_2 t}.$$

После того как $p_0(t)$ стало известно, из уравнений (IV. 1. 3) при $k=1$ находим $p_1(t)$, затем из (IV. 1. 3) при $k=2$ находим $p_2(t)$ и т. д. Последовательно можно найти решения для всех $p_k(t)$ при $k=0, 1, 2, \dots, N_3$. Таким путем можно убедиться, что $p_k(t)$ имеет вид линейной комбинации экспонент:

$$p_k(t) = \sum_{i=0}^k a_i e^{-\lambda h(i)t}, \quad (IV.1.5)$$

где $h(i) = (N_1 - i)(N_2 - i)$, а коэффициенты a_i задаются формулами

$$a_i = \prod_{\substack{j=i \\ 0 \leq j \leq k}} (h(j) - h(i))^{-1} \prod_{j=0}^{k-1} k(j).$$

Здесь \prod — знак произведения.

По определению среднего, среднее число молекул вида C , присутствующих в момент t в растворе, задается формулой

$$m(t) = Mx(t) = \sum_{k=0}^{N_3} k p_k(t).$$

Здесь M — знак математического ожидания. Из анализа распределения (IV. 1. 5) можно заключить, что при больших значениях N_3 математическое ожидание величины $m(t)$ имеет порядок N_3 . Среднеквадратичное отклонение (т. е. корень квадратный из дисперсии) $x(t)$ от $m(t)$ имеет порядок $\sqrt{N_3}$.

Из уравнений (IV. 1. 1), (IV. 1. 3) можно вывести дифференциальное уравнение для $m(t)$:

$$dm(t)/dt = \lambda(N_1 - m(t))(N_2 - m(t)) + Dx(t), \quad (\text{IV. 1. 6})$$

где $Dx(t)$ — дисперсия величины $x(t)$. При больших N_3 последним слагаемым в (IV. 1. 6) можно пренебречь и для $m(t)$ получим уравнение

$$dm(t)/dt = \lambda(N_1 - m(t))(N_2 - m(t)), \quad m(0) = 0. \quad (\text{IV. 1. 7})$$

Это уравнение представляет собой закон действующих масс, который строго справедлив для идеальных систем (идеальные газы, разбавленные растворы).

Этот закон верен лишь приближенно, когда число молекул велико. В задачах, связанных с поведением небольших количеств взаимодействующих объектов, нужно вместо закона действующих масс использовать модель (IV. 1. 1), (IV. 1. 3). Уравнения типа (IV. 1. 1), (IV. 1. 3) можно написать и исследовать в случае многостадийных реакций с учетом обратных процессов, при моделировании цепных реакций и в ряде других случаев.

Следует сделать еще одно важное замечание. Закон действующих масс мы получили в предположении, что N_3 велико и что вероятность встречи двух молекул A и B пропорциональна произведению $N_1 N_2$. Так будет, если молекулы свободно перемещаются в растворе. Но если они включены в сколько-нибудь жесткие комплексы, это уже не так. Вероятности перехода в рассматриваемой системе будут иметь уже иную структуру. Подобные соображения играют важную роль, например, при моделировании переноса заряда при фотосинтезе, где переносчики, во всяком случае часть из них, входят в сложные мультиферментные комплексы (см. § 2 настоящей главы).

Приведем еще один пример, показывающий, как реальный процесс может отличаться от модели, основанной на динамике средних значений. Пусть имеется некоторый вид бактерий, которые делятся через определенные промежутки времени. Выберем временной масштаб так, чтобы деления происходили синхронно в «целые» моменты времени: $t=0, 1, 2, \dots$. Предположим, что каждая особь может погибнуть через единицу времени с вероятностью p_0 и с вероятностью $p(k=1, 2, 3, \dots)$ превратиться через единицу времени в k особей: $\sum_{k=0} p_k = 1$. Пусть отдельные бактерии делятся независимо от своих предков и от бактерий своего поколения.

Обозначим μ среднее число потомков у одной особи:

$$\mu = \sum_k p_k k.$$

Очевидно, что если в момент $t=0$ была только одна бактерия, то к моменту t будет в среднем μ^t бактерий. Если $\mu > 1$, то среднее число бактерий со временем экспоненциально быстро растет. Тем не менее существует ненулевая вероятность p_0 того, что в момент $t=1$ (а стало быть, и далее) не будет ни одной бактерии. Вероятность гибели к моменту времени $t=2$ еще больше:

$$p_0 + \sum_{k=1} p_k p_0^k.$$

К моменту $t=3$ эта вероятность еще возрастает. Вообще можно доказать, что вероятность вымирания на каком-либо шагу p вычисляется как наименьший корень уравнения $f(z) = z$, где $f(z) = \sum p_k z^k$. Эта вероятность даже при $\mu > 1$ может быть как угодно близка к 1. Таким образом, хотя среднее число особей растет экспоненциально быстро, процесс может с большой вероят-

ностью вырождаться. Этот эффект нельзя заметить на моделях, отражающих динамику средних значений, здесь необходима вероятностная модель.

Целый ряд биологических объектов хорошо описывается с помощью марковских процессов с конечным или счетным множеством состояний. К этому классу случайных процессов, в частности, относятся процессы, возникающие в двух предыдущих примерах. Напомним основные понятия, связанные с такими процессами.

Пусть система может находиться в одном из N состояний l_1, \dots, l_N . Если в момент $t \geq 0$ система находится в состоянии l_i , то она проведет в нем еще некоторое случайное время τ_i , большее заданного периода времени S , с вероятностью $p\{\tau_i > S\} = e^{-\lambda_i S}$, где λ_i — положительная константа. По определению, при $S=0$ $p\{\tau_i > 0\} = S$. Затем система совершит переход в одно из состояний, отличных от l_i . При этом скачок из l_i в l_j , $i \neq j$, произойдет с вероятностью q_{ij} независимо от того, что происходило с системой до момента перехода $\sum_{i \neq j} q_{ij} = 1$. В этом и заключается марковский характер процесса. Числа

λ_i и q_{ij} ($i, j=1, \dots, N$) полностью определяют вероятностные закономерности эволюции данной системы. Как было показано, числа q_{ij} имеют смысл вероятностей того, что при выходе из i -го состояния система сразу перейдет в состояние l_j . Вычисляя среднее значение $M\tau_i$, получим

$$M\tau_i = \int_0^{\infty} t e^{-\lambda t} \lambda dt = \lambda_i^{-1},$$

так что величина, обратная λ_i , представляет собой среднее время, проведенное системой в l_i до первого выхода из этого состояния.

Обозначим $p_{ij}(t)$ вероятность того, что система, находившаяся в какой-то момент в состоянии l_i , через время t будет находиться в l_j . Числа $p_{ij}(t)$ называются вероятностями перехода за время t . Как функции от t вероятности перехода удовлетворяют некоторым дифференциальным уравнениям, называемым уравнениями Колмогорова. Частный случай таких уравнений будет рассмотрен в следующем параграфе при изучении вероятностной модели переноса электрона в мультиферментном комплексе.

Пусть $r_k(t)$ — вероятность нахождения системы в состоянии k в момент t . Принимая во внимание, что переходы в системе носят марковский характер, можно считать, что вероятность нахождения системы в состоянии k в момент $(t + \Delta t)$ выразится как сумма произведений вероятностей нахождения системы в каждом из состояний l ($l=1, 2, \dots, N$) на вероятности переходов из этих состояний в k -е состояние $p_{ik}(\Delta t)$ за время Δt .

$$r_k(t + \Delta t) = \sum_{l=1}^N r_l(t) p_{lk}(\Delta t) \quad (k=1, 2, \dots, N) \tag{IV.1.8}$$

Из (IV.1.8) вытекает дифференциальное уравнение для $r_k(t)$:

$$\frac{dr_k(t)}{dt} = \sum p_{lk} r_l(t), \text{ где } p_{lk} = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} p_{lk}(\Delta t). \tag{IV.1.9}$$

Это уравнение полностью определяет эволюцию распределений вероятностей состояний системы. В частности, из уравнений (IV. 1. 9) следует, что все стационарные, т. е. не измененные во времени распределения $\bar{r} = (\bar{r}_1, \bar{r}_2, \dots, \bar{r}_N)$, удовлетворяют системе алгебраических уравнений

$$\sum_{l=1}^N p_{lk} \bar{r}_l = 0.$$

Таких стационарных распределений в системе может быть несколько, но если переходы между состояниями достаточно интенсивны, то стационарное распределение единственно. Более того, для марковских процессов в этом случае $r(t)$ при $t \rightarrow \infty$ сходится к единственному стационарному распределению.

Таким образом, через большое время функционирования в системе устанавливается распределение по состояниям, не зависящее от начальных условий. Это и позволяет характеризовать системы, в которых происходят марковские процессы, определенным распределением вероятностей состояний. Уравнения (IV. 1. 9) дают возможность проследить, как происходит установление такого стационарного распределения (уравнения (IV. 1. 7) для бимолекулярной химической реакции как раз и являются уравнениями (IV. 1. 9) для марковского процесса, описывающего эту реакцию).

При описании динамики биологических систем встречаются и другие классы случайных процессов. Важную роль, например, играют процессы диффузии. Эти процессы были описаны в § 4 гл. II. В ряде областей, особенно в физиологии и экологии, важную роль играют стационарные случайные процессы, характеристики которых изучают методами математической статистики.

§ 2. Вероятностное описание переноса электрона в мультиферментном комплексе

Вероятностное рассмотрение позволило разработать математический аппарат для описания функционирования мультиферментного комплекса. Рассмотрим некий мультиферментный комплекс, в котором каждый из ферментов может находиться в нескольких различных (дискретных) состояниях. Состояния отдельных компонентов мультиферментного комплекса могут представлять собой свободный фермент, комплекс фермента с субстратом, продуктом, модификатором; это могут быть различные конформации фермента, его протонированные или депротонированные формы и др.

Функциональное объединение ферментов в мультиферментный комплекс приводит к необходимости рассматривать вместо состояний отдельных ферментов всевозможные состояния такого мультиферментного комплекса, которые определяют как упорядоченный набор состояний отдельных ферментов, составляющих комплекс. Такая необходимость возникает, например, в том случае, когда значения констант скорости перехода между состояниями любого отдельного фермента зависят от того, в каком состоянии находятся другие ферменты данного комплекса. Учет состояний мультиферментного комплекса в целом необходим также и в том случае, если продукт одного из ферментов непосредственно передается другому, являясь для него субстратом.

Элементарные переходы между отдельными состояниями мультиферментного комплекса носят стохастическую (вероятностную) природу. При этом в первом приближении можно считать, что процесс переходов между состояниями носит марковский характер, т. е. вероятности переходов между отдельными состояниями i и j мультиферментного комплекса в каждый момент времени можно характеризовать некоторыми числами k_{ij} , не зависящими от предыстории системы.

Обозначим состояния мультиферментного комплекса через S_1, S_2, \dots, S_n и введем вероятность того, что комплекс находится в состоянии S_i в момент времени $t: p(S_i, t) = p_i(t)$ ($i=1, 2, \dots, n$). Определенные нами состояния мультиферментного комплекса, с одной стороны, несовместны, т. е. невозможна такая ситуация, когда мультиферментный комплекс находится сразу в двух

состояниях, а с другой — комплекс обязательно находится в одном из введенных состояний. Поэтому для любого момента времени

$$\sum_{i=1}^n p_i(t) = 1. \quad (\text{IV.2.1})$$

Предположим, что если комплекс находится в i -м состоянии в момент времени t , то вероятность перейти ему в j -е состояние за время Δt может быть выражена как $a_{ij} \Delta t$, $i \neq j$. Здесь a_{ij} — константа скорости перехода. Пусть, кроме того, вероятность того, что через время Δt комплекс останется в исходном состоянии, есть $1 - a_i \Delta t$.

Поскольку вероятности представляют собой неотрицательные величины, необходимо потребовать, чтобы

$$a_{ij} \geq 0; \quad i \neq j. \quad (\text{IV. 2. 2})$$

Если в момент времени t система находилась в i -м состоянии, то в момент времени $(t + \Delta t)$ она либо останется в исходном состоянии (с вероятностью $1 - a_i \Delta t$), либо перейдет в одно из $n - 1$ остальных возможных состояний (с вероятностью $a_{ij} \Delta t$):

$$1 - a_i \Delta t + \sum_{j \neq i} a_{ij} \Delta t = 1.$$

Отсюда следует, что величина a_i удовлетворяет равенству

$$a_i = \sum_{j \neq i} a_{ij}. \quad (\text{IV. 2. 3})$$

С учетом сделанных предположений уравнения, описывающие кинетическое поведение мультиферментного комплекса, можно записать в следующем виде:

$$p_i(t + \Delta t) = \Delta t \sum_{j \neq i} a_{ij} p_j(t) + (1 - a_i \Delta t) p_i(t).$$

Действительно, вероятность нахождения комплекса в момент времени $(t + \Delta t)$ в состоянии i складывается из вероятности того, что в предшествующий момент времени t он находился в одном из $n - 1$ других состояний и за время Δt перешел в i -е состояние, а также вероятности того, что исходно в момент времени t комплекс уже находился в этом состоянии и за время Δt остался в нем же.

Устремляя Δt к нулю, приходим к следующей системе линейных дифференциальных уравнений:

$$dp_i/dt = -a_i p_i + \sum_{j \neq i} a_{ij} p_j; \quad p_i(0) = c_i \geq 0; \quad \sum_{i=1}^n c_i = 1. \quad (\text{IV. 2. 4})$$

Полученная система дифференциальных уравнений и есть класс дифференциальных уравнений, описывающих переходы между состояниями мультиферментного комплекса. Относительно коэффициентов этих уравнений всегда можно считать выполненными соотношения (IV. 2. 2), (IV. 2. 3).

Вероятностное описание мультиферментного комплекса оказалось особенно продуктивным при математическом моделировании переноса электрона в комплексах молекул-переносчиков, локализованных в энергосопряженных мембранах митохондрий и фотосинтезирующих органелл — хлоропластов растений и хроматофоров фотосинтезирующих бактерий. На примере описания переноса электрона в фотосинтетических комплексах молекул — компонентов электрон-транспортной цепи — будут рассмотрены основные особенности вероятностного описания мультиферментного комплекса.

Процессы трансформации энергии при дыхании и фотосинтезе включают в себя в качестве необходимого элемента перенос электронов по электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), образованной встроенными в мембрану окислительно-восстановительными ферментами. ЭТЦ митохондрий, хлоропластов и хроматофоров фотосинтезирующих бактерий имеют большое сходство как на уровне

отдельных переносчиков электронов, так и на уровне отдельных комплексов молекул-переносчиков. Одна полная цепь переноса электрона состоит из нескольких отдельных комплексов. Эти комплексы — естественные субъединицы цепи, в полной мере способные осуществлять перенос электрона. Кроме того, в ЭТЦ имеются участки, на которых перенос электрона происходит с помощью отдельных переносчиков. Соответственно при математическом описании процессов следует учитывать различия в организации отдельных участков электронного транспорта.

В том случае, когда переносчики электронов достаточно подвижны для того, чтобы взаимодействовать друг с другом посредством соударений, окислительно-восстановительные состояния отдельных переносчиков можно считать независимыми и кинетика переноса электрона может быть описана исходя из закона действующих масс (см. § 1 настоящей главы).

В соответствии с законом действующих масс для реакции переноса электрона между двумя одноэлектронными переносчиками C_1 и C_2 , взаимодействующими по схеме



кинетиические уравнения, описывающие рассматриваемые окислительно-восстановительные реакции, могут быть записаны в виде

$$\begin{aligned} d[C_1^0] / dt &= k_1 [D^1] [C_1^0] - k_2 [C_1^0] [C_2^0]; \\ d[C_2^0] / dt &= k_2 [C_1^0] [C_2^0] - k_3 [C_2^0] [A^0]. \end{aligned} \quad (\text{IV.2.5})$$

Здесь $[D^1]$, $[C_1^0]$, $[C_2^0]$ — концентрации восстановленной формы экзогенного донора D и переносчиков электронов C_1 и C_2 ; $[C_1^0]$, $[C_2^0]$ — концентрации окисленной формы переносчиков C_1 , C_2 и экзогенного акцептора A ; k_1 , k_2 , k_3 — бимолекулярные константы скоростей соответствующих реакций.

Пусть теперь переносчики электронов находятся в структурных комплексах, внутри которых задана строгая последовательность взаимодействия переносчиков электрона друг с другом. В отличие от случая окислительно-восстановительных реакций в растворе, когда каждая восстановленная молекула переносчика C_1 могла отдать электрон любой окисленной молекуле C_2 , в комплексе восстановленный переносчик C_1 может взаимодействовать только с тем окисленным переносчиком C_2 , который находится с C_1 в одном комплексе. Таким образом, события, характеризующие окисленность и восстановленность переносчиков C_1 и C_2 , не являются независимыми.

Перенос электронов в комплексе — мономолекулярный процесс, поскольку в едином акте происходит как окисление C_1 , так и восстановление C_2 . В силу этого перенос электрона невозможен, когда оба входящие в комплекс переносчика одновременно окислены или восстановлены. Таким образом, следует рассматривать состояния сразу комплекса двух переносчиков, участвующих в процессе. Скорость переноса электрона между C_1 и C_2 в рассматриваемом случае пропорциональна концентрации комплексов, находящихся в состоянии $[C_1^0 C_2^0]$, когда переносчик C_1 восстановлен, а переносчик C_2 — окислен:

$$v = k_2 [C_1^0 C_2^0].$$

Для той же скорости окислительно-восстановительной реакции в растворе существовало выражение

$$v = k_2 [C_1^0] [C_2^0],$$

где $[C_1]$, $[C_2^0]$ —общие концентрации молекул C_1 и C_2 в восстановленной и окисленной форме соответственно.

В общем случае для описания переноса электрона в комплексе необходимо рассматривать все состояния, в которых может находиться этот комплекс. Состояния комплекса могут быть определены как упорядоченная совокупность состояний переносчиков, составляющих комплекс. При этом каждый из переносчиков, входящих в комплекс, может находиться в окисленной и восстановленной форме, в протонированном или депротонированном состоянии и т. д.

Обозначим состояния комплекса через S_1, S_2, \dots, S_n и введем вероятность того, что комплекс переносчиков находится в состоянии S_i в момент времени t : $p(S_i, t) = p_i(t)$. События S_1, S_2, \dots, S_n несовместны и образуют полную группу событий, поэтому выполняется условие нормировки

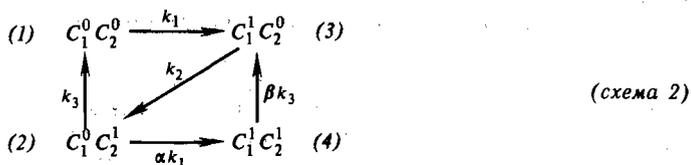
$$p_1(t) + p_2(t) + \dots + p_n(t) = 1.$$

Будем рассматривать переходы между состояниями S_i комплекса переносчиков как марковский процесс с конечным числом состояний и непрерывным временем. В этом случае переходы комплекса из одного состояния в другое описываются системой линейных обыкновенных дифференциальных уравнений относительно вероятностей:

$$dp_i/dt = \sum_{j=1}^n (p_j k_{ji} - p_i k_{ij}); \quad p_i(0) = b_i \quad (i = 1, \dots, n); \quad (IV. 2. 6)$$

Здесь b_i —начальные значения вероятностей соответствующих состояний.

При рассмотрении конкретных ЭТЦ удобно представлять состояния комплекса в виде размеченного графа, в вершинах которого стоят состояния комплекса, а стрелки указывают возможные переходы между состояниями. В частности, для переноса электронов в комплексе из двух переносчиков (схема 1) размеченный граф состояний будет иметь следующий вид:



Здесь верхние индексы 0 и 1 означают отсутствие или наличие электрона на соответствующем переносчике. Цифры в скобках указывают номер состояния комплекса, k_i — константы скоростей соответствующих переходов, указанных на схеме 1. В общем случае константы скоростей перехода между состояниями комплекса могут зависеть от состояний переносчиков, не принимающих непосредственного участия в реакции (эффект кооперативности). Параметры α и β характеризуют степень кооперативности. Например, скорость притока электронов от внешнего донора на переносчик C_1 может быть различной в зависимости от редокс-состояния переносчика C_2 ($\alpha \neq 1$). Рассмотрение конкретных фотосинтезирующих объектов (см. § 5 гл. XXVIII) показало плодотворность такого способа описания кооперативности для объяснения механизмов регуляции электронных потоков (свойство кооперативности не может быть, естественно, учтено при описании переноса электрона с помощью закона действующих масс).

Система дифференциальных уравнений для вероятностей состояний комплекса $C_1 C_2$, описывающая его функционирование согласно схеме 2, при $\alpha = \beta = 1$ имеет вид

$$\begin{aligned}
 dp_1/dt &= k_3 p_2 - k_1 p_1; \\
 dp_2/dt &= k_2 p_3 - (k_1 + k_3) p_2; \\
 dp_3/dt &= k_1 p_1 + k_3 p_4 - k_2 p_3; \\
 dp_4/dt &= k_1 p_2 - k_3 p_4; \quad p_i(0) = b_i.
 \end{aligned}
 \tag{IV. 2. 7}$$

Решив систему уравнений (V. 2. 7) относительно вероятностей состояний комплекса p_i , легко найти и вероятности определенных состояний отдельных переносчиков. Для этого необходимо просуммировать вероятности всех тех состояний комплекса, которые содержат рассматриваемый переносчик в данном состоянии. Например, вероятность того, что первый переносчик находится в окисленном состоянии, равна сумме вероятностей первого и второго состояний (см. схему 2):

$$p(C_1^0) = p(C_1^0 C_2^0) + p(C_1^0 C_2^1) = p_1 + p_2 = 1 - p(C_1^1). \tag{IV. 2. 8}$$

В общем виде

$$p(C_i^0, t) = \sum_{S_q \in C_i^0} p(S, t); \quad p(C_i^1, t) = 1 - p(C_i^0, t),$$

$$\text{или } p(B) = \sum_{S_q \in B} p(S_q, t), \tag{IV. 2. 9}$$

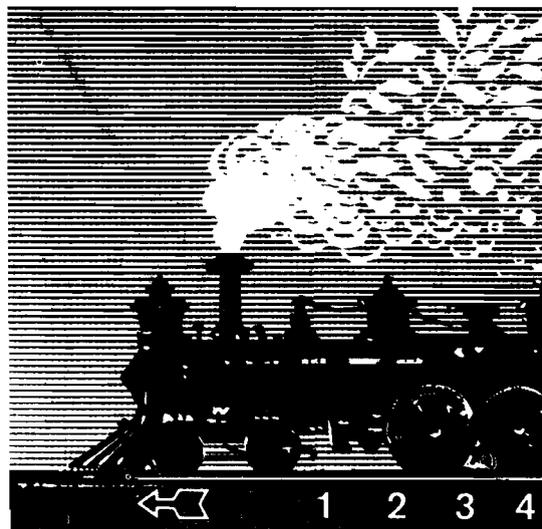
где суммирование производится по всем тем элементарным событиям, которые составляют событие B .

Для большого числа одинаковых не взаимодействующих между собой комплексов переносчиков введенные выше вероятности $p(S_i, t)$ и $p(C_i^0, t)$, согласно закону больших чисел, приближенно равны соответственно доле комплексов, находящихся в состоянии S_i , и доле молекул переносчиков C_1 , которые находятся в соответствующем редокс-состоянии.

Легко видеть, что уравнения, описывающие переходы между состояниями мультиферментного комплекса, линейны. Система таких уравнений может быть решена аналитически или с помощью ЭВМ. Однако число этих уравнений быстро увеличивается с ростом количества переносчиков. Например, для комплекса из n переносчиков, каждый из которых может быть окисленным или восстановленным, число состояний равно 2^n . Однако иерархия характерных времен переходов между состояниями позволяет сильно упростить систему и установить аналитически некоторые качественные свойства системы.

II

Термодинамика биологических процессов



V

Термодинамика систем
вблизи равновесия
(линейная термодинамика)

VI

Термодинамика систем
вдали от равновесия
(нелинейная термодинамика)

Способность поглощать, трансформировать энергию в различных формах и использовать ее в процессах метаболизма для обеспечения роста, развития, размножения составляет одно из важнейших свойств живых систем. Общие закономерности процессов энергообмена, сопровождающих биохимические превращения, изучают с помощью методов классической химической термодинамики, где рассматривают трансформацию энергии в химических процессах при совершении полезной работы. На этом пути были получены важные результаты по оценке изменения (увеличение или уменьшение) свободной энергии в различных биохимических процессах, на основании чего можно было судить о термодинамической возможности их сопряжения.

Метаболические процессы — окислительно-восстановительные реакции, синтез и гидролиз макроэргических соединений, транспорт веществ и ионов через мембраны, двигательная активность, утилизация энергии света в фотосинтезе, — связанные с трансформацией энергии, подчиняются закону сохранения энергии, или первому закону термодинамики. Однако из непосредственного рассмотрения этого закона выпадает фактор времени, характеризующий сам процесс перехода, поскольку оценку энергетических эффектов тех или иных превращений получают путем сравнения параметров начального и конечного состояний системы.

Согласно второму закону термодинамики вводят величину, называемую энтропией, которая в изолированной системе всегда возрастает при достижении равновесия до своего максимального значения. Закон увеличения энтропии в изолированных системах является критерием эволюции на пути достижения конечного равновесного состояния. Однако в открытой системе в равновесном состоянии не происходит никаких направленных процессов, кроме случайных флуктуаций около положения равновесия, что равносильно прекращению существования биологической системы.

В открытых системах может установиться стационарное состояние, критерии достижения которого и представляют наибольший интерес. Это означает, что необходимо учитывать роль фактора времени, поскольку стационарное состояние будет результатом направленного изменения переменных (концентраций веществ), характеризующих химические процессы. Поэтому энергетические превращения в открытых системах следует характеризовать не только с точки зрения их общего статистического баланса, но и рассчитывать скорости трансформации энергии в единицу времени.

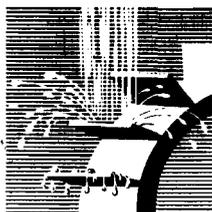
Для этого необходимо провести анализ взаимосвязи различных кинетических процессов, связанных с потреблением и освобождением энергии. Расчеты скоростей изменения свободной энергии основаны на кинетической схеме, учитывающей характер изменения соответствующих концентраций реагентов в химических процессах. Особое значение приобретают проблемы устойчивости стационарных состояний, критерии достижения их вдали от равновесия, а также

термодинамика автоколебательных процессов, процессов самоорганизации, имеющих большое биологическое значение. Органическое слияние кинетического и термодинамического подходов — характерная черта современного этапа в развитии термодинамики необратимых процессов.

В системах, находящихся вблизи равновесия, главными становятся результаты, полученные с помощью соотношений Онзагера в области энергетического сопряжения. В системах, находящихся вдали от равновесия, термодинамика сталкивается с проблемой поиска критериев эволюции и устойчивости стационарных состояний. В этой области термодинамика уже целиком основана на исходных математических моделях и ее результаты могут служить лишь дополнительной иллюстрацией для понимания особенностей динамического поведения открытых систем. Это в полной мере относится к автоколебательным процессам, триггерному переключению системы из одного режима в другой и, наконец, к процессам самоорганизации. Все эти вопросы включены в разделы, посвященные проблемам нелинейной термодинамики.

Глава V

Термодинамика систем вблизи равновесия (линейная термодинамика)



§ 1. Первый и второй законы термодинамики

Предметом термодинамики является рассмотрение общих закономерностей превращения энергии при ее переносе в форме теплоты и работы между телами.

В зависимости от характера обмена энергии и массы с окружающей средой через границы системы различают три группы систем. Изолированные системы не обмениваются с внешней средой ни энергией, ни массой, они полностью изолированы от влияния окружающей среды. Системы, которые через свои границы обмениваются энергией с окружающей средой, но не могут обмениваться массой (веществом), относятся к закрытым системам. Открытые системы обмениваются с окружающей средой и энергией, и массой.

Всякая система характеризуется определенными свойствами, или термодинамическими параметрами. Их совокупность определяет термодинамическое состояние системы, поэтому изменение хотя бы одного из параметров приводит к изменению термодинамического состояния системы в целом.

Процессы, протекающие в системе и изменяющие ее состояние, могут быть равновесными или неравновесными. Равновесные, или обратимые, процессы протекают в системе таким образом, что вызванные ими изменения в состоянии системы могут произойти в обратной последовательности без дополнительных изменений в окружающей среде. Наоборот, неравновесные, или необратимые, процессы, к которым относятся реальные превращения в природе, не обладают этими свойствами, и их протекание в обратном направлении сопровождается остаточными изменениями в окружающей среде. В классической термодинамике рассматриваются главным образом равновесные состояния системы, при которых ее параметры сохраняют свое значение во всех точках системы и не изменяются самопроизвольно во времени.

Первый закон термодинамики. Этот закон — обобщение многовекового опыта человечества, он является законом сохранения энергии в применении к процессам преобразования теплоты.

Обычная запись первого закона термодинамики имеет вид

$$\delta Q = dU + \delta A \quad (\text{V. 1. 1})$$

и означает, что теплота δQ , поглощенная системой из внешней среды, идет на увеличение внутренней энергии dU системы и совершение работы δA против внешних сил.

В общем случае δA включает работу против сил внешнего давления $p dv$ и максимальную полезную работу $\delta A'_{\max}$, сопровождающую химические превращения:

$$\delta A = \delta A'_{\max} + p dv. \quad (\text{V. 1. 2})$$

Попытки проверить опытным путем справедливость первого закона термодинамики для биологических объектов предпринимались уже давно.

Лавуазье и Лаплас (1780) измеряли в ледяном калориметре количество теплоты и CO_2 , выделяемого организмом морской свинки, а затем сравнивали полученные величины с тепловым эффектом реакции сжигания исходных продуктов питания до CO_2 .

Такого рода измерения показали, что потребление 1 л O_2 и выделение 1 л CO_2 при прямом сжигании или окислении в организме продуктов сопровождается выделением 21, 2 кДж теплоты. Совпадение тепловых эффектов в обоих случаях и для других реакций свидетельствует, очевидно, о том, что пути превращения продуктов питания в метаболических процессах и в химических реакциях вне живой клетки являются эквивалентными с точки зрения суммарных тепловых эффектов. Иными словами, для процессов метаболизма также справедлив известный в физической химии закон Гесса, что дает возможность рассчитывать тепловые эффекты сложных биохимических циклов, если известны лишь их начальные и конечные продукты.

Прямые опыты показали, что количество энергии, поглощенной за сутки человеческим организмом вместе с питательными веществами, равно выделенной за это же время теплоте. Этот результат подтверждает справедливость для организмов первого закона термодинамики. Следовательно, сами по себе организмы не являются независимым источником какой-либо новой формы энергии.

Второй закон термодинамики. Этот закон устанавливает критерий, отражающий одностороннюю направленность необратимых процессов независимо от их конкретной природы.

Согласно второму закону, состояние системы может быть описано особой функцией состояния — энтропией S . Изменение энтропии dS определяется суммарным значением поглощенных системой приведенных теплот Q/T . При бесконечно малом изменении состояния системы изменение энтропии dS равно или больше значения поглощенной системой элементарной приведенной теплоты $\delta Q/T$ (если процесс носил соответственно равновесный или неравновесный характер):

$$dS \geq \delta Q/T. \quad (\text{V. 1. 3})$$

Для системы, не совершающей теплообмена с внешней средой, $\delta Q = 0$ и уравнение (V. 1. 3) принимает вид

$$dS \geq 0. \quad (\text{V. 1. 4})$$

Следовательно, в изолированной системе энтропия остается неизменной в равновесных и возрастает в неравновесных процессах. Это и является критерием направленности превращений в изолированной системе. Таким образом, протекающий в изолированной системе самопроизвольный неравновесный процесс всегда вызывает увеличение энтропии до ее максимальных значений при окончании процесса и установлении термодинамического равновесия.

Максимальная полезная работа. $\delta A'_{\text{max}}$ связана с термодинамическими функциями свободной энергии

$$F = U - TS \quad (\text{V. 1. 5})$$

и полного термодинамического потенциала G

$$G = U + pv - TS, \quad (\text{V. 1. 6})$$

которые вводятся на основании первого и второго законов и зависят от переменных $F = F(T, v)$, $G = G(T, p)$.

При $T, v = \text{const}$

$$\delta A'_{\text{max}} \leq -d(U - TS) = TdS - dU = -(dF)_{T, v}, \quad (\text{V. 1. 7.})$$

а при $T, p = \text{const}$

$$\delta A'_{\text{max}} \leq -d(U + pv - TS) = TdS - dU - pdv = -(dG)_{T, p}, \quad (\text{V. 1. 8.})$$

где знак « \leq » соответствует необратимым процессам.

По величине характеристических функций F и G можно судить о направлении самопроизвольных процессов и установлении равновесия в системе. Действительно, при отсутствии полезной работы

$$(dF)_{T, v} \leq 0, \quad (dG)_{T, p} \leq 0, \quad (\text{V. 1. 9.})$$

т. е. величины F и G убывают при неравновесных процессах, а при равновесии остаются постоянными и достигают при этом минимальных значений. Условиями устойчивого равновесия будут уравнения

$$\begin{aligned} (dF)_{T, v} = 0; \quad (d^2F)_{T, v} > 0; \\ (dG)_{T, p} = 0; \quad (d^2G)_{T, p} > 0. \end{aligned} \quad (\text{V. 1. 9a.})$$

В большинстве случаев изменения объема и давления в биохимических превращениях незначительны, поэтому величины

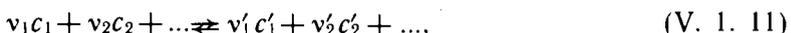
$$\begin{aligned} dF &= -SdT - pdv; \\ dG &= -SdT + vdp = dF + pdv + vdp \end{aligned}$$

практически совпадают:

$$\Delta F \approx \Delta G. \quad (\text{V. 1. 10.})$$

На основании второго закона термодинамики можно по хорошо известным в физической химии выражениям вычислять изменения свободной энергии F или полного термодинамического потенциала G , которые сопровождают биохимические превращения.

Так, если известно значение константы равновесия K реакции



то можно воспользоваться формулой

$$\Delta G_0 = -RT \ln K + RT \ln \frac{c_1^{v'_1} c_2^{v'_2} \dots}{c_1^{v_1} c_2^{v_2} \dots}. \quad (\text{V. 1. 12.})$$

где $-RT \ln K = \Delta G_0$ — стандартное значение ΔG ; T — температура; R — газовая постоянная; $c_1, c_2, \dots, c'_1, c'_2, \dots$ — концентрация реагентов в смеси; $v_1, v_2, \dots, v'_1, v'_2$ — их стехиометрические коэффициенты. Если все $c_j = 1$, второй член в правой части (V. 1. 12) обращается в нуль и $\Delta G = \Delta G_0$.

Например, для реакции глюкозо-1-фосфат \rightleftharpoons глюкозо-6-фосфат значение константы равновесия $K = 17$ при $\text{pH} = 7$; следовательно, $\Delta G_0 = -1,987 \times 298,15 \cdot 2,303 \ln 17 = -7140$ кДж/моль. Данный термодинамический результат ($\Delta G_0 < 0$) показывает, что в стандартных условиях реакция трансфосфорилирования протекает самопроизвольно.

Возможно определение ΔG_0 из значений стандартных окислительно-восстановительных потенциалов с помощью хорошо известного в термодинамике выражения

$$\Delta G_0 = -nF \Delta E_0, \quad (\text{V. 1. 13.})$$

где n — число переносимых электронов; F — число Фарадея (96,864 кДж/моль); ΔE_0 — разность стандартных окислительно-восстановительных потенциалов реагирующих веществ. Например, для реакции обратимого окисления янтарной кислоты до фумаровой $\Delta E_0 = 0,437$ В, что при $n = 2$ дает значение $\Delta G_0 = -84,659$ кДж/моль и указывает на спонтанный характер этого процесса в стандартных условиях.

Существуют и другие способы расчета ΔG_0 , которые достаточно полно освещены в курсах биохимии; их рассмотрение выходит за рамки настоящего учебника. Все они основаны на обычных представлениях классической термодинамики, согласно которым полное изменение свободной энергии в системе сопоставляют с достижением равновесного конечного состояния в соответствующей биохимической реакции. Непосредственно характер самого изменения свободной энергии во времени здесь не учитывают.

§ 2. Второй закон термодинамики в открытых системах

Непосредственное применение второго закона классической термодинамики к открытым системам, в которых протекают неравновесные процессы, встречает ряд трудностей.

Действительно, критерием направления самопроизвольных изменений в изолированной системе служит увеличение энтропии S , а конечным состоянием — состояние равновесия. В то же время открытые системы, в первую очередь биологические, прекращают свое функционирование как таковые в состоянии равновесия.

В термодинамическом отношении открытые (биологические) системы в процессе своего изменения проходят через ряд неравновесных состояний, что, в свою очередь, также сопровождается соответствующими изменениями термодинамических переменных.

В целом поддержание неравновесных состояний в открытых системах возможно лишь за счет создания в них соответствующих потоков вещества и энергии.

Таким образом, открытым системам присущи неравновесные состояния, параметры и свойства которых, вообще говоря, есть функции времени. Для термодинамического потенциала G и свободной энергии F это означает, что $G = G(T, p, t)$; $F = F(T, v, t)$.

Изменение энтропии открытой системы. Оно может происходить либо за счет процессов обмена системы с внешней средой ($d_e S$), либо за счет возникновения энтропии в самой системе вследствие внутренних необратимых изменений ($d_i S$).

Постулируется, что общее изменение энтропии открытой системы (dS) складывается из двух независимых частей:

$$dS = d_e S + d_i S. \quad (V. 2. 1)$$

В этом состоит исходное положение термодинамики необратимых процессов.

Если внутри системы протекают обратимые изменения, то они не сопровождаются возникновением энтропии и $d_i S = 0$. Во всех случаях необратимых изменений $d_i S > 0$. Очевидно, для изолированных систем, где $d_e S = 0$, выражение (V. 2. 1) сводится к

$$dS = d_i S > 0, \quad (V. 2. 2)$$

что соответствует классической формулировке второго закона термодинамики для изолированных систем.

Если в каком-либо участке открытой системы одновременно протекают различные необратимые процессы, то величина $d_i S > 0$ описывает приращение энтропии, являющееся следствием взаимодействия этих необратимых процессов друг с другом.

Именно разделение величины изменения энтропии открытой системы на две составляющие $d_e S$ и $d_i S$ позволяет изучать различия в термодинамических свойствах открытых и изолированных систем.

Продифференцируем выражение (V. 2. 1):

$$dS/dt = d_e S/dt + d_i S/dt. \quad (V. 2. 3)$$

Полученное уравнение означает, что скорость изменения энтропии системы dS/dt равна скорости обмена энтропией между системой и окружающей средой плюс скорость возникновения энтропии внутри системы.

Член $d_e S/dt$, учитывающий процессы обмена системы со средой, может быть и положительным, и отрицательным, так что при $d_i S/dt > 0$ общая энтропия системы может как возрасти, так и убывать.

Положительная величина $d_e S/dt > 0$ связана с увеличением энтропии системы в результате обмена веществом и энергией с внешней средой. Отрицательная величина $d_e S/dt < 0$ соответствует тому, что отток положительной энтропии от системы во внешнюю среду превышает приток положительной энтропии извне, так что в результате общая величина баланса обмена энтропией между системой и средой является отрицательной. Очевидно, что при одном и том же условии $d_i S/dt > 0$ возможны следующие три случая:

- 1) $dS/dt > 0$, если $d_e S/dt > 0$
или если $d_e S/dt < 0$, но $|d_e S/dt| < d_i S/dt$;
- 2) $dS/dt < 0$, если $d_e S/dt < 0$ и $|d_e S/dt| > d_i S/dt$;
- 3) $dS/dt = 0$, если $d_e S/dt < 0$ и $|d_e S/dt| = d_i S/dt$.

Последний случай соответствует установлению в системе стационарного состояния, при котором продуцирование энтропии в системе $d_i S/dt$ компенсируется оттоком положительной энтропии во внешнюю среду, так что общее изменение энтропии равно нулю:

$$dS = d_e S + d_i S = 0; \quad dS/dt = d_e S/dt + d_i S/dt = 0. \quad (V. 2. 4)$$

Анализ общих свойств биологических систем на основе уравнения (V. 2. 3) помог объяснить внешнее противоречие между поведением организмов и вторым законом классической термодинамики. Действительно, рост и развитие организмов сопровождаются усложнением их организации и с точки зрения классической термодинамики выглядят как самопроизвольное уменьшение энтропии живых систем, что, конечно, явно противоречит второму закону. Однако это противоречие лишь кажущееся, поскольку направление самопроизвольных процессов определяется увеличением энтропии лишь для изолированных систем, а отнюдь не для открытых, какими являются биологические системы. В реальных условиях развитие организмов, сопровождающееся уменьшением общей величины их энтропии, происходит при условии

$$d_e S/dt < 0; \quad |d_e S/dt| > d_i S/dt$$

за счет того, что в других участках внешней среды идут сопряженные процессы с образованием положительной энтропии.

Общий энергообмен земных организмов можно упрощенно представить как образование в фотосинтезе сложных молекул углеводов из CO_2 и H_2O с последующей деградацией продуктов фотосинтеза в процессах дыхания. Именно этот энергообмен обеспечивает существование и развитие как отдельных организмов — звеньев в круговороте энергии, так и в жизни на Земле в целом. С этой точки зрения, уменьшение энтропии живых систем в процессах их

жизнедеятельности обусловлено в конечном итоге поглощением квантов света фотосинтезирующими организмами, что, однако, с избытком компенсируется образованием положительной энтропии в ядерных реакциях на Солнце. Этот принцип относится и к отдельным организмам, для которых поступление извне питательных веществ, несущих приток «отрицательной» энтропии, всегда сопряжено с продуцированием положительной энтропии при их образовании в других участках внешней среды, так что суммарное изменение энтропии в системе организм + внешняя среда всегда положительно. Точно так же уменьшение энтропии в части клетки, где идет биохимический синтез, происходит за счет избыточного увеличения энтропии в других частях организма или среды.

Уменьшение энтропии живых систем в ходе потребления пищевых продуктов и энергии Солнца одновременно приводит к увеличению их свободной энергии. Приток «отрицательной» энтропии извне не следует непосредственно связывать лишь с увеличением организованности живых структур и с потерей «организованности» поглощаемых питательных веществ. Именно деградация последних и ведет к освобождению необходимой организму свободной энергии. Таким образом, поток отрицательной энтропии необходим для компенсации процесса возникновения положительной энтропии и убыли свободной энергии в клетке в результате самопроизвольных реакций метаболизма. В сущности, речь идет о круговороте и превращениях свободной энергии, за счет которой поддерживается функционирование живых структур.

Вычисление величины $d_i S$. В открытых системах, где протекают процессы, приводящие к изменению химического состава веществ, вычисление $d_i S$ представляет собой главную проблему.

Если внутри открытой системы достигнуто равновесие в отношении распределения температуры (но не химического состава реагентов) и процессы обмена со средой протекают равновесно, такая система находится в частично равновесном состоянии. Общее изменение энтропии для нее составит

$$dS = d_e S + d_i S,$$

где $d_e S = \delta Q/T$ описывает изменение энтропии открытой системы в результате ее равновесного теплообмена с окружающей средой, а член $d_i S$ соответствует самопроизвольному возрастанию энтропии внутри системы за счет химических превращений веществ, находившихся в начальном неравновесном состоянии, и совершению при этом полезной работы.

Отсюда следует, что

$$d_i S = dS - d_e S = dS - \delta Q/T. \quad (V. 2. 5)$$

Так как поглощенная теплота приводит только к совершению механической работы, а вся полезная работа $\delta A'_{\max}$ в системе совершается за счет внутренних самопроизвольных химических реакций, то первый закон термодинамики имеет вид

$$\delta Q = dU + pdv. \quad (V. 2. 6)$$

Подставляя в (V.2.5) выражение (V. 2. 6), получим, что

$$d_i S = (1/T) (TdS - dU - pdv). \quad (V. 2. 7)$$

Согласно (V. 1. 8),

$$dG = -TdS + dU - pdv, \quad (V. 2. 8)$$

откуда следует, что

$$d_i S = -dG/T > 0 \quad (T, p = \text{const}) \quad (V. 2. 9)$$

или

$$d_i S/dt = -(1/T) (dG/dt) > 0. \quad (V. 2. 10)$$

Таким образом, согласно (V. 2. 5), (V. 2. 9), скорость возникновения энтропии в открытой системе при постоянных температуре и давлении пропорциональна скорости уменьшения ее термодинамического потенциала.

В соответствии с ранее сделанным предположением в частично равновесной системе единственной причиной необратимости, а значит, уменьшения ее термодинамического потенциала ($-dG < 0$) и увеличения энтропии ($d_i S > 0$) являются химические реакции, самопроизвольное протекание которых приводит к изменению химического состава системы и соответствующему совершению полезной работы. Можно показать, что выражение (V. 2. 10) для химических превращений преобразуется к виду

$$d_i S/dt = (1/T) A v > 0, \quad (\text{V. 2. 11})$$

где v — скорость химической реакции: A — химическое сродство, или движущая сила химической реакции, представляющая собой разность химических потенциалов начальных и конечных продуктов реакции с учетом их стехиометрических коэффициентов:

$$A = - \sum_k \mu_k \nu_k, \quad (\text{V. 2. 12})$$

где μ_k , ν_k — соответственно химический потенциал и стехиометрический коэффициент k -го реагента;

$$\mu_k = \mu_k^0 + RT \ln [c_k]. \quad (\text{V. 2. 13})$$

При $\nu_k = 1$ $A = \mu_{\text{нач}} - \mu_{\text{кон}}$, т. е. движущая сила A процесса равна разности химических потенциалов начальных и конечных реагентов. Таким образом, согласно (V. 2. 11), скорость возникновения энтропии в химических процессах пропорциональна произведению значений движущей силы и скорости реакции. Выражение (V. 2. 11) применимо и к системе, когда в ней одновременно протекают несколько необратимых процессов, каждый из которых характеризуется собственным значением сродства и скорости. Тогда

$$d_i S/dt = A_1 v_1 + A_2 v_2 + \dots + A_n v_n > 0. \quad (\text{V. 2. 14})$$

Сопряжение процессов. Энергетическое сопряжение биохимических процессов играет большую роль в метаболизме. Пусть в системе одновременно протекают две необратимые реакции. Очевидно, что условие (V. 2. 14)

$$A_1 v_1 + A_2 v_2 > 0 \quad (\text{V. 2. 15})$$

может выполняться не только при

$$A_1 v_1 > 0, A_2 v_2 > 0, \quad (\text{V. 2. 16})$$

но и когда

$$A_1 v_1 < 0, A_2 v_2 > 0. \quad (\text{V. 2. 17})$$

Первая реакция в этом случае называется сопряженной, вторая — сопрягающей. Именно их термодинамическое сопряжение позволяет сопряженной реакции протекать в таком направлении, когда величина A_1 и v_1 обладают разными знаками.

Условия (V. 2. 16), (V. 2. 17) дают верхний предел скорости сопряженной реакции

$$v_1 \leq \frac{A_2 v_2}{A_1}, \quad (\text{V. 2. 18})$$

существование которого позволяет связать чисто термодинамическую величину химического сродства с важнейшей кинетической характеристикой процесса — его скоростью. Существование термодинамического сопряжения позволя-

ет по-новому подойти к оценке энергетической эффективности системы реакций клеточного метаболизма по сравнению с методами классической термодинамики. Необратимые процессы, приводящие к рассеянию энергии, являются причиной тепловой деградации свободной энергии системы. Однако сопряжение необратимых изменений частично предотвращает эти потери, обеспечивая тем самым основной путь преобразования и запасаения энергии метаболических реакций в живой системе в форме химических связей и клеточных структур. При этом общее изменение энтропии d_iS/dt для сопряженных энергетических процессов остается положительным (V. 2. 14).

Связь величины d_iS/dt с теплопродукцией. Существует множество исследований, где делаются попытки оценить скорость изменения энтропии биологических систем путем экспериментального определения их теплопродукции. Эти работы основаны на предположении, что величина энтропии самих реагирующих веществ не изменяется в ходе реакции. Сродство (A) процесса оказывается непосредственно связанным с его тепловым эффектом ($r_{T,p}$), равным изменению энтальпии (H) в ходе реакции:

$$A = -\left(\frac{\partial H}{\partial \xi}\right)_{T,p} + T\left(\frac{\partial S}{\partial \xi}\right)_{T,p} = r_{T,p}, \quad (\text{V. 2. 19})$$

где $(\partial S/\partial \xi)_{T,p} = 0$; ξ — степень полноты реакции, определяемая изменением числа молей реагентов $d\xi = dn_k/(v_k r)$. Тогда скорость продуцирования энтропии пропорциональна тепловому эффекту:

$$\frac{d_iS}{dt} = \frac{Av}{T} \simeq \frac{r_{T,p}}{T} v = \frac{1}{T} \left(\frac{dQ}{dt}\right)_{T,p}. \quad (\text{V. 2.20})$$

Таким образом, зная тепловые эффекты и скорость процесса, можно вычислить скорость продуцирования энтропии, сопровождающего его протекание (опыты обычно проводят в специальных микрокалориметрах, позволяющих измерять скорость теплопродукции системы).

Однако применение уравнения (V. 2. 20), справедливого для простых химических реакций, встречает целый ряд трудностей при изучении биологических систем. Как следует из этого уравнения, оно связывает теплопродукцию с химическими процессами A , v , в которых совершается полезная работа. Именно эти рабочие процессы, за счет которых происходит рост и развитие организмов, представляют интерес при рассмотрении связей между жизнедеятельностью живых систем и изменением их энтропии. Между тем в организмах значительная часть поступающих извне соединений расходуется без совершения работы на теплопродукцию, эквивалентную разности их внутренних энергий и продуктов выделения. Этими процессами, в частности, обеспечивается поддержание температуры тела теплокровных животных.

Само по себе протекание рабочих процессов в организме также сопровождается выделением теплоты, которая учитывается в формуле (V. 2. 20). Однако эта теплопродукция составляет, очевидно, лишь часть общего термогенеза. Кроме того, существенным обстоятельством является наличие термодинамического сопряжения, которое обеспечивает запасаение в биологических структурах части энергии, освобождаемой в ходе необратимых рабочих процессов. Образование АТФ, сопряженное с процессами окисления, представляет собой наиболее важный пример.

Очевидно, в этом случае тепловой поток, обусловленный необратимыми процессами окислительного фосфорилирования, может изменяться в зависимости от степени сопряжения процессов свободного окисления с реакциями непосредственно фосфорилирования (см. гл. XXIV).

Таким образом, часть энергии, запасенной в биологических структурах организма, ведет к уменьшению продукции энтропии и определяется степенью сопряжения реакции. Кроме того, важной особенностью биологических процессов является то, что вещества, участвующие в реакциях, сами претерпевают

существенные структурные изменения, которые сопровождают непрерывный синтез и распад динамических структур клетки. Это и может привести к тому, что энтропия самих реагентов будет заметно изменяться по мере протекания реакции, т. е. в (V. 2. 19) $(\partial S/\partial \xi)_{T,p} \neq 0$, что не учитывается в (V. 2. 20).

В этом случае величина сродства перехода не может быть связана только с сопутствующими тепловыми эффектами (V. 2. 19), а зависит и от энтропии реагентов. Примером могут быть различные конформационные перестройки в молекулах ферментов, участвующих в метаболических процессах и изменяющих в их ходе свою энтропию. Следовательно, попытки определить скорость продуцирования энтропии в биологических системах на основе простых калориметрических опытов не могут дать однозначных результатов для изучения термодинамических свойств целых организмов.

Строго говоря, такие измерения применимы лишь в случае простых химических систем либо в отношении хорошо изученных отдельных процессов клеточного метаболизма.

§ 3. Соотношение между значениями движущих сил и скоростей процессов

Соотношение между значениями движущих сил и скоростей процессов играет важную роль в термодинамике биологических систем. Необходимо, не ограничиваясь анализом только химических процессов (V. 2. 11), рассмотреть также перенос через мембраны теплоты, вещества и заряженных частиц. Обозначим через X значение движущих сил, а через J — значение потока, или суммарной скорости соответствующего потока.

Очевидно, что во всех случаях возрастание энтропии имеет вид

$$d_i S/dt = (1/T)XJ > 0. \quad (\text{V. 3. 1})$$

Соотношения Оизагера. Если открытая система находится вблизи термодинамического равновесия, когда значения движущих сил весьма малы ($A/(RT) \ll 1$), а сами процессы протекают достаточно медленно ($J \approx 0$), то X и J связаны следующим соотношением:

$$J = LX, \quad (\text{V. 3. 2})$$

где L — постоянный, или линейный, коэффициент.

Справедливость линейных соотношений (V. 3. 2) подтверждается, например, законом Ома, где значение потока электричества I пропорционально движущей силе — разности потенциалов U , а $L = 1/R$ — линейный коэффициент пропорциональности $I = U/R$.

Аналогичное соотношение имеет место в случае простой диффузии вещества или переноса теплоты через мембрану между скоростью процесса и градиентом соответствующего параметра по обе стороны мембраны:

$$\begin{aligned} dc/dt &\sim \text{grad } c \text{ (закон Фика);} \\ dQ/dt &\sim \text{grad } T \text{ (закон Фурье),} \end{aligned}$$

где c — концентрация; Q — количество теплоты; T — температура.

Для химических процессов вблизи равновесия, когда скорости прямой и обратной реакций почти равны между собой, также справедливо выражение

$$v = LA, \quad (\text{V. 3. 3})$$

где v — суммарная скорость процесса, равная разности скоростей прямой и обратной реакций.

Особый интерес представляет случай, когда в системе одновременно протекает несколько процессов, каждый из которых характеризуется собствен-

ными значениями скорости и движущей силы. Эти процессы могут взаимодействовать друг с другом так, что скорость каждого из них будет зависеть и от движущих сил всех других процессов, т. е. каждый поток зависит не только от «своей силы», но и от всех других сил.

Для двух взаимодействующих процессов (J_1, X_1) и (J_2, X_2) это допущение можно записать следующим образом:

$$\begin{aligned} J_1 &= L_{11}X_1 + L_{12}X_2; \\ J_2 &= L_{21}X_1 + L_{22}X_2, \end{aligned} \quad (\text{V. 3. 4})$$

где коэффициенты L_{12} , L_{21} соответствуют возможной взаимосвязи двух потоков и называются коэффициентами взаимности Онзагера.

Соотношения типа (V. 3. 4) применимы, например, в случае одновременной диффузии вещества и переноса теплоты или переноса электрического тока и диффузии ионов.

Коэффициенты взаимности L_{12} и L_{21} могут иметь любой знак, однако между ними существует важное соотношение:

$$L_{12} = L_{21}. \quad (\text{V. 3. 5})$$

Это так называемое соотношение взаимности Онзагера показывает, что если поток 1-го необратимого процесса испытывает влияние сродства X_2 необратимого 2-го процесса через посредство коэффициента L_{12} , то и поток 2-го процесса также испытывает влияние сродства X_1 через посредство того же самого коэффициента $L_{21} = L_{12}$.

Выражение для скорости продуцирования энтропии (V. 2. 14) в случае двух процессов примет теперь вид

$$\begin{aligned} \beta = T \frac{d_i S}{dt} &= J_1 X_1 + J_2 X_2 = (L_{11}X_1 + L_{12}X_2)X_1 + (L_{21}X_1 + L_{22}X_2)X_2 = L_{11}X_1^2 + (L_{12} + L_{21})X_1 X_2 + L_{22}X_2^2 = \\ &= L_{11}X_1^2 + 2L_{12}X_1 X_2 + L_{22}X_2^2 > 0. \end{aligned} \quad (\text{V. 3. 6})$$

В общем случае, когда в системе одновременно протекает k процессов,

$$\beta = T \frac{d_i S}{dt} = \sum_k J_k X_k > 0, \quad (\text{V. 3. 7})$$

где $J_k = \sum_j L_{kj} X_j$ при $L_{kj} = L_{jk}$, откуда следует

$$\beta = T \frac{d_i S}{dt} = \sum_k \sum_j L_{kj} X_j X_k. \quad (\text{V. 3. 8})$$

В выражении (V. 3. 8) силы подбираются таким образом, чтобы размерности правых и левых частей совпадали [Дж·с⁻¹].

Соотношения Онзагера (V. 3. 4), (V. 3. 5) играют важную роль в термодинамике необратимых процессов и, кроме того, находят непосредственное использование в анализе свойств биологических систем. Так, используя эти соотношения, можно, определяя значения коэффициентов L_{jk} , установить количественную связь между одновременно протекающими в клетке процессами.

Например, пусть через мембрану проходят поток воды J_1 и поток J_2 какого-либо растворенного в ней вещества. Движущей силой потока воды J_1 будет, очевидно, разность давления $X_1 = \Delta p$ между фазами, а поток растворенного вещества относительно растворителя J_2 будет приводиться в действие в результате разности осмотических давлений $X_2 = \Delta \pi_s$ по обе стороны мембраны.

В соответствии с (V. 3. 4), (V. 3. 5) будем считать, что каждый из потоков воды и растворенного вещества сопряжен с силами Δp и $\Delta \pi_s$. Тогда

$$\begin{aligned} J_1 &= L_{11}X_1 + L_{12}X_2 = L_{11} \Delta p + L_{12} \Delta \pi_s; \\ J_2 &= L_{21}X_1 + L_{22}X_2 = L_{21} \Delta p + L_{22} \Delta \pi_s. \end{aligned} \quad (\text{V. 3. 9})$$

Формула (V. 3. 9) означает, что поток воды J_1 не может рассматриваться только в качестве однозначной функции разности гидростатического давления ($X_1 = \Delta p$), а зависит и от потока другого вещества. Применение уравнений (V.3. 9) позволило понять взаимосвязь этих процессов и, в частности, ввести коэффициент избирательности мембраны

$$\sigma = -L_{21}/L_{11}, \quad (\text{V. 3. 10})$$

который показывает степень проницаемости мембраны для определяемого вещества.

Величина σ в (V. 3. 10) указывает одновременно и на механизм переноса растворенного вещества. В самом деле, если $\sigma \rightarrow 0$, то при $L_{11} \neq 0$ $L_{21} \rightarrow 0$. Следовательно, перенос вещества через грубую мембрану совершается независимо от движения воды. При $\sigma = 1$ $L_{11} = -L_{21}$, что свидетельствует о взаимосвязи потоков вещества и воды в случае полупроницаемой мембраны. Значение коэффициента σ можно найти экспериментально путем определения величины потока воды в отсутствие гидростатического давления ($\Delta p = 0$) под действием лишь разности осмотического давления ($\Delta \pi_s \neq 0$). Подобным образом можно рассмотреть и более сложные процессы транспорта вещества и электрических заряженных частиц через мембраны.

Пассивный транспорт. Скорость продуцирования энтропии для потока воды $J_{\text{H}_2\text{O}}$, одиночного электролита J_s и электрического тока I имеет вид

$$\beta = J_{\text{H}_2\text{O}} \Delta \mu_{\text{H}_2\text{O}} + J_s \Delta \mu_s + I \Delta \phi, \quad (\text{V. 3. 11})$$

где $\Delta \mu_{\text{H}_2\text{O}}$, $\Delta \mu_s$, $\Delta \phi$ — разности потенциалов для воды, электролита и электрических зарядов.

Соответствующие феноменологические уравнения типа (V. 3. 9) содержат уже шесть независимых коэффициентов Онзагера, которые можно определить, меняя экспериментальные условия транспортных процессов.

В этом примере перенос заряженных частиц осуществляется пассивно под действием разности электрических потенциалов и концентраций вещества по обе стороны мембраны. Состояние вещества в фазе определяется электрохимическим потенциалом $\bar{\mu}$, который складывается из химического потенциала μ вещества (V. 2. 13) и электрического потенциала ϕ фазы:

$$\bar{\mu} = \mu + nF\phi, \quad (\text{V. 3. 12})$$

где F — число Фарадея; n — число электронов, переносимых в элементарном акте окислительно-восстановительной реакции (подробнее см. § 1 гл. XVIII). При равновесии I и II фаз имеет место равенство

$$\bar{\mu}_I = \bar{\mu}_{II}, \text{ или } \mu_{oI} + RT \ln [c]_I + nF\phi_I = \mu_{oII} + RT \ln [c]_{II} + nF\phi_{II}.$$

При $\mu_{oI} = \mu_{oII}$ можно получить выражение для равновесного значения электрических потенциалов на мембране

$$\Delta \phi = \phi_I - \phi_{II} = (RT/nF) (\ln [c]_{II} / [c]_I), \quad (\text{V. 3. 13})$$

которое понадобится в дальнейшем (см. гл. XVIII).

Активный транспорт. Если перенос через мембрану носит активный характер, то он совершается за счет энергии метаболических процессов и в этом случае может идти против градиента электрохимического потенциала. Рассмотрим два сопряженных между собой процесса (J_1, X_1) и (J_2, X_2):

$$J_1 = L_{11}X_1 + L_{12}X_2; \quad (\text{V. 3. 14})$$

$$J_2 = L_{21}X_1 + L_{22}X_2, \quad L_{12} = L_{21}.$$

где первый процесс — сопряженный — идет против градиента движущей силы

$X_1 (J_1 X_1 < 0)$ за счет энергии второго сопрягающего процесса ($J_2 X_2 > 0$). Количественной мерой сопряженности этих процессов является величина

$$q = L_{12} / \sqrt{L_{11} L_{22}}, \quad (\text{V. 3. 15})$$

которая меняется в пределах

$$-1 \leq q \leq 1. \quad (\text{V. 3. 16})$$

При $q=0$, $L_{12}=L_{21}=0$ и два процесса полностью не зависят друг от друга, а их потоки пропорциональны значениям «собственных» сил:

$$J_1 = L_{11} X_1 \text{ и } J_2 = L_{22} X_2.$$

Значения $q = \pm 1$ достигаются только для полностью сопряженных систем. При $q < 0$ увеличение движущей силы одного процесса приводит к уменьшению потока сопряженного с ним процесса.

Эффективность сопряжения зависит от соотношения

$$\left| \frac{J_1 X_1}{J_2 X_2} \right|$$

и может достигать значений 80—90% (например, для окислительного фосфорилирования). В энергетических процессах скорости сопряженного (J_1 — синтез АТФ) и сопрягающего (J_2 — окисление субстрата) процессов находятся под контролем сопрягающего механизма. Снижение скорости J_2 в начальный период функционирования системы одновременно сопровождается ростом движущей силы X_1 до максимальных значений. В установившемся стационарном состоянии сопряженный поток $J_{\text{стан}} = 0$, а $X_1 = X_1^{\text{max}}$. В то же время

$$J_2 = L_{12} X_1 + L_{22} X_2 = L_{22}(1 - q^2) X_2.$$

В полностью сопряженной системе $q^2 = 1$ и соответственно J_2 также обращается в нуль ($J_{\text{стан}} = 0$). Система дыхательного контроля в митохондриях определяет зависимость скорости окисления субстрата (J_2) и изменение отношения АДФ/АТФ, т. е. движущей силы (X_1) сопряженного процесса. Ясно, что эти соотношения носят феноменологический характер и сами по себе не раскрывают механизмов функционирования Н-АТФазы (см. гл. XXIV).

§ 4. Термодинамические критерии достижения и устойчивости стационарных состояний

В стационарном состоянии концентрации промежуточных продуктов перестают изменяться со временем, что достигается при определенных соотношениях между скоростями различных химических процессов, ответственных за образование и распад промежуточных соединений (см. гл. I). В открытой системе суммарное изменение энтропии в стационарном состоянии равно нулю: $dS = d_e S + d_i S = 0$. Однако при этом члены $d_e S$ и $d_i S$, соответствующие процессам обмена системы с окружающей средой и внутренним необратимым процессам внутри системы, отличны от нуля. Возникает вопрос: каким образом изменение энтропии за счет самопроизвольных необратимых процессов внутри открытой системы связано с установлением в ней стационарного неравновесного состояния? Иными словами, можно ли по характеру изменения во времени величины $d_i S / dt$ предсказать установление в открытой системе стационарного состояния? В такой постановке эта проблема сходна с проблемой классической термодинамики о предсказании направления самопроизвольных необратимых процессов в изолированной системе на основе характера изменения ее энтропии. В последнем случае необратимые изменения всегда идут в направлении увеличения энтропии, которая достигает своего максимального значения в конечном равновесном состоянии [см. (V. 1. 4)].

Другим важным вопросом является устойчивость неравновесных стационарных состояний к внешним возмущениям и самопроизвольным флуктуациям в системе и изучение этих свойств по изменению величины продуцирования энтропии.

Теорема Пригожина. Рассмотрим открытую систему, в которой одновременно протекают необратимые процессы (вблизи состояния термодинамического равновесия, где справедливы линейные соотношения между значениями скоростей и сродства и соотношения взаимности Онзагера (V. 3. 4); (V. 3. 5). Согласно (V. 3. 8),

$$\beta = J_1 X_1 + J_2 X_2 > 0, \quad (\text{V. 4. 1})$$

а феноменологические уравнения будут

$$\begin{aligned} J_1 &= L_{11} X_1 + L_{12} X_2; \\ J_2 &= L_{21} X_1 + L_{22} X_2. \end{aligned} \quad (\text{V. 4. 2})$$

Пусть в стационарном состоянии $\bar{J}_1 = 0$. В случае химической реакции это означает, что изменение концентрации соответствующего промежуточного вещества не происходит во времени в стационарном состоянии, $dc_k/dt = 0$. Для процессов переноса теплоты или диффузии вещества через мембрану равенство $\bar{J} = 0$ соответствует постоянной стационарной скорости, при которой количество переносимой через мембрану в единицу времени теплоты или вещества остается постоянным. Значение скорости продуцирования энтропии описывается выражением (V. 3. 6) и имеет вид

$$Td_s/dt = \beta(X_1, X_2) = L_{11} X_1^2 + 2L_{12} X_1 X_2 + L_{22} X_2^2. \quad (\text{V. 4. 3})$$

Нас будет интересовать характер зависимости величины β от X_1 , поскольку, по предположению, именно X_1 претерпевает такие изменения, которые в конечном итоге приводят к установлению стационарного состояния $\bar{J}_1 = 0$. Возьмем частную производную $\partial\beta/\partial X_1$ в (V. 4. 3) при постоянном X_2 . Получим

$$\partial\beta/\partial X_1 = 2(L_{11} X_1 + L_{12} X_2) = 2J_1. \quad (\text{V. 4. 4})$$

Как видно, условия

$$\bar{J}_1 = 0 \text{ и } (\partial\beta/\partial X_1)_{X_2 = \text{const}} = 0 \quad (\text{V. 4. 5})$$

эквивалентны в области линейной термодинамики, т. е. там, где справедливы линейные соотношения (V. 3. 4), (V. 3. 5). Очевидно, что уравнение $\partial\beta/\partial X_1 = 0$ (см. (V. 4.5)) определяет существование экстремума функции $\beta(X_1, X_2)$. Так как величина β является существенно положительным квадратичным выражением во всей области изменения независимого переменного $X_1 \geq 0$, то равенство нулю производной $\partial\beta/\partial X_1 = 0$ является условием минимума.

Аналогичным образом легко получить условия стационарности и для другого потока:

$$\bar{J}_2 = 0; (\partial\beta/\partial X_2)_{X_1 = \text{const}} = 0. \quad (\text{V. 4. 6})$$

Это заключение будет справедливо и в общем случае, если в системе протекает несколько процессов, связанных между собой уравнениями Онзагера. Формулы (V. 4. 5) и (V. 4. 6) выражают следующий важный результат, полученный в термодинамике необратимых процессов для открытых систем, находящихся вблизи равновесного состояния.

При неизменных внешних условиях в частично равновесной открытой системе в стационарном состоянии, близком к термодинамическому равновесию, значение скорости прироста энтропии за счет внутренних необратимых процессов достигает отличного от нуля постоянного минимального положительного значения.

Принцип минимума прироста энтропии, или теорема Пригожина, представляет собой количественный критерий для определения общего направления самопроизвольных изменений в открытой системе, иными словами, критерий ее эволюции. По изменению величины ежесекундного прироста энтропии можно предсказать переход системы в конечное стационарное состояние, если все эти процессы протекают вблизи равновесия.

В самом деле, вблизи равновесия величина β монотонно уменьшается, $d\beta < 0$ или

$$d\beta/dt < 0, \tag{V.4.7}$$

постепенно приближаясь к минимальному постоянному положительному значению по мере достижения конечного стационарного состояния. Это означает, что выражение (V. 4. 7) и является критерием эволюции систем к стационарному состоянию вблизи равновесия.

На рис. V. 1 представлены в виде графиков полученные выводы. Неравенства (V. 4. 7) одновременно приводят к выводу и об устойчивости стационарных состояний. Действительно, если система находится в стационарном состоянии, то она не может самопроизвольно выйти из него за счет внутренних необратимых изменений. Если же в результате флуктуаций система незначительно удаляется от стационарного состояния, то в силу (V. 4. 7) в ней должны произойти такие внутренние изменения, которые вновь возвратят ее к исходному стационарному состоянию (рис. V. 1. I). Это и означает, что данное стационарное состояние является устойчивым, а возвращение в него при незначительных

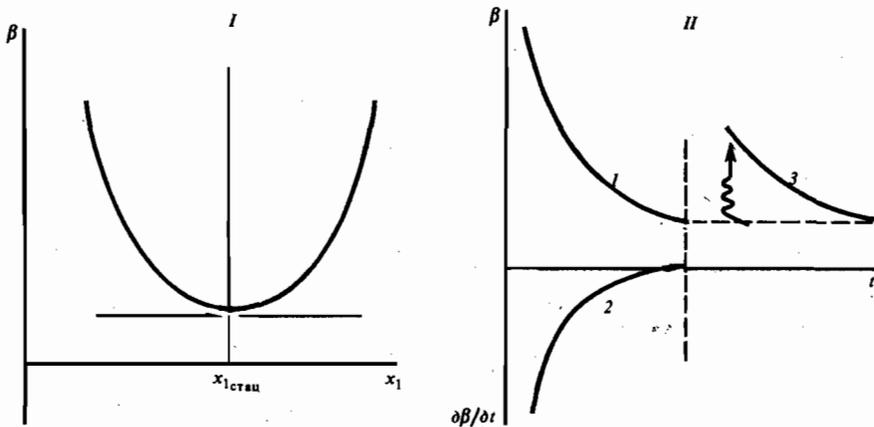


Рис. V.1. Скорость продуцирования энтропии около стационарной точки: I — зависимость величины $\beta = Td_i S/dt$ от движущих сил около стационарной точки x_1 ; II — зависимость от времени величины β (1, 3) и $d\beta/dt$ (2) при приближении к стационарному состоянию вблизи равновесия (вертикальная пунктирная линия соответствует моменту перехода системы в стационарное состояние)

возмущениях аналогично проявлению известного принципа Ле-Шателье — устойчивости равновесных состояний. Очевидно, условие устойчивости стационарного состояния имеет вид

$$d\beta > 0 \tag{V. 4. 8}$$

Знак положительного неравенства показывает, что любое отклонение от устойчивого стационарного состояния вызовет увеличение скорости продуцирования энтропии.

Этот вывод справедлив и для открытых систем, где происходят не только химические реакции, но совершаются и другие процессы, характеризующиеся значениями потоков J_k и обобщенных сил X_k . Пусть в результате возмущения величина потока J_k изменится на δJ_k , тогда

$$J_k^* = \bar{J}_k + \delta J_k = \bar{J}_k + L_{kk} \delta X_k. \quad (\text{V. 4. 9})$$

Так как в стационарном состоянии $\bar{J} = 0$, то, следовательно,

$$J_k^* = L_{kk} \delta X_k, \quad (\text{V. 4. 10})$$

т. е. величина потока J_k^* , возникшего в возмущенной системе, пропорциональна значению движущей силы δX_k . Так как коэффициент пропорциональности $L_{kk} > 0$, то из (V. 4. 10) легко получить

$$\beta^* = J_k^* \delta X_k = L_{kk} (\delta X_k)^2 > 0, \quad (\text{V. 4. 11})$$

где β^* — скорость приращения энтропии, связанного с процессами, которые возникают в системе в результате возмущения. Неравенство

$$J_k^* \delta X_k > 0 \quad (\text{V. 4. 12})$$

означает, что величина потока, вызванного возмущением, должна иметь тот же знак, что и величина самого возмущения δX_k . Иными словами, возникший в устойчивой возмущенной системе поток J_k^* будет стремиться уменьшить возмущение δX_k и тем самым вернуть систему в первоначальное состояние.

Из монотонного характера изменения величины β (V. 4. 7) вытекает важный вывод о том, что вблизи равновесия в системе невозможны периодические автоколебательные процессы, рассмотренные в гл. II. В самом деле, при движении по замкнутым траекториям переменные концентрации в системе, а значит величины J и X , будут периодически принимать одни и те же значения, что несовместимо с однонаправленным монотонным изменением β и ее постоянством в стационарной точке.

Пользуясь терминологией гл. I, можно заключить, что вблизи равновесия устойчивому стационарному состоянию соответствует особая точка «устойчивый узел».

Биологические приложения. Существует большое количество работ, посвященных анализу различных биологических явлений на основе развитых выше представлений термодинамики необратимых процессов. В основном они связаны либо с исследованием общих свойств живых систем, таких, как рост, развитие, адаптация к внешним условиям, либо с изучением отдельных конкретных процессов клеточного метаболизма.

Среди работ первой группы следует прежде всего отметить попытки создать общую термодинамическую теорию роста, впервые выдвинутую И. Р. Пригожиным и Дж. М. Виам в 1946—1947 гг.

В соответствии с этой теорией развитие и рост организмов происходят самопроизвольно и непрерывно в направлении достижения конечного стационарного состояния, что должно сопровождаться уменьшением скорости продуцирования энтропии, отнесенной к единице массы объекта, до минимальных значений в конечном стационарном состоянии. При этом скорость образования энтропии должна оставаться минимальной и постоянной.

Как было показано в (V. 2. 2), о скорости продуцирования энтропии в некоторых случаях можно судить по выделению потока теплоты, который сопровождает необратимые изменения в системе. Именно это обстоятельство лежит в основе измерений удельной теплопродукции организмов.

Авторы таких работ исходят из того, что основной поток теплоты в клетке действительно отражает удельную скорость продуцирования энтропии. В то же

время теплопродукция клетки обусловлена процессами дыхания или анаэробного гликолиза и поэтому может быть оценена по характеру поглощения кислорода или образованию гликолитических продуктов.

Существует большой экспериментальный материал, иллюстрирующий приложение изложенных выше представлений к биологическим процессам развития зародышей, роста и старения организмов, регенерации тканей после поражения.

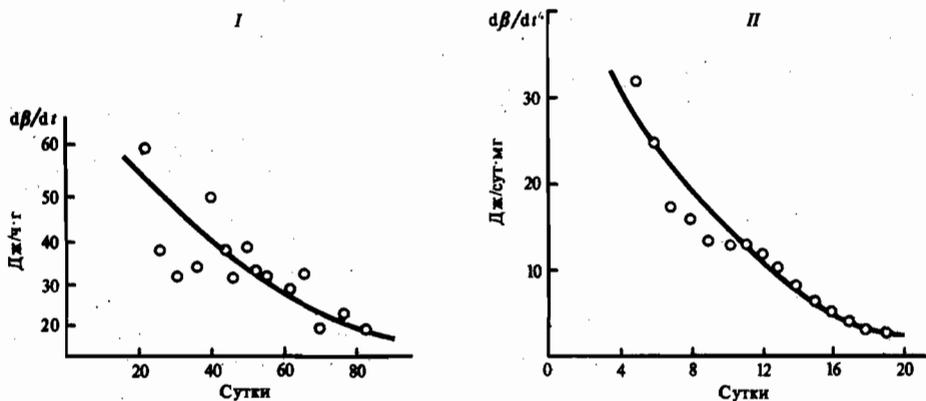


Рис. V.2. Скорость теплопродукции $d\beta/dt$ икры форели (I) и яиц кур (II) (по А. И. Зотину, 1973)

Измерения скорости теплопродукции, отнесенной к единице сухой массы, показали на различных объектах, что этот параметр непрерывно уменьшается, начиная с первых стадий развития организма. На рис. (V. 2) изображены типичные кривые теплопродукции зародышей рыб (икры форели) и зародышей кур (целые яйца). Измерения удельной интенсивности дыхания в те же периоды эмбрионального развития обнаруживают сходные картины. Аналогичные исследования, проведенные на животных организмах и человеке, позволили получить данные по уменьшению удельной скорости продуцирования энтропии и интенсивности дыхания, аналогично результатам, характеризующим период эмбрионального развития. Сходная картина может наблюдаться не только на целых организмах, но и на изолированных органах и тканях.

Таким образом, существующие экспериментальные материалы не противостоят положениям теории Пригожина — Виам. Однако сам по себе факт изменения удельной теплопродукции в ходе различных биологических процессов описанным выше образом является необходимым, но не достаточным условием пребывания системы в области линейной термодинамики. Следовательно, эти данные не могут подтвердить справедливость исходных предпосылок теории роста Пригожина — Виам. Очевидно, что для строгого приложения термодинамики необратимых процессов в этой области необходимо было бы определить природу соответствующих движущих сил и доказать наличие пропорциональных соотношений между ними и скоростями роста и развития организмов.

Ясно, что в настоящее время общее кинетическое описание основных процессов роста не представляется возможным, поскольку неизвестно подробно, каким образом характер их взаимодействия определяет его конечный результат.

На этом примере видны и трудности в применении представлений термодинамики к описанию сложных систем. В самом деле, для проверки выполнения линейных соотношений Онзагера и в любом случае для вычисления скорости диссипации энергии или теплопродукции на всем протяжении развития необходимо знать характер дифференциальных уравнений, описывающих кинетику превращений веществ в изучаемом объекте. Однако поведение такой системы во времени определяется кинетическими закономерностями, а вычисление на основе кинетических данных термодинамических диссипативных функций мало что дает нового в отношении предсказанного поведения системы во времени по сравнению с кинетическим анализом ее динамических свойств. В этом случае вычисление скорости продуцирования энтропии может иметь значение только для оценки энергетической эффективности рассматриваемых процессов, тем более что существуют трудности (V. 2. 20) в интерпретации данных по термогенезу сложных биологических систем, зависящему от степени сопряжения процессов и, следовательно, от состояния мембранных структур.

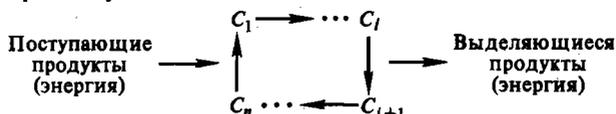
Применение методов термодинамики необратимых процессов является оправданным в случае сравнительно простых и частных реакций клеточного метаболизма, для которых существует соответствующее кинетическое описание, но не в случае такого рода явлений, как рост и развитие организма, включающих всю совокупность метаболических реакций.

Термодинамика метаболических циклов. Большой интерес представляют собой попытки оценить энергетическую эффективность (КПД) метаболических циклов на основе развитых выше представлений термодинамики необратимых процессов.

Как известно, метаболический цикл представляет собой открытую систему последовательных реакций, в ходе которых поступающий субстрат перерабатывается таким образом, что происходит регенерация исходного продукта.

Реакции цикла на каждом из промежуточных звеньев могут сопровождаться выбросом в окружающую среду продуктов превращения и поступлением извне субстрата, а также диссипацией энергии, заключенной в молекулах последнего. Использование клеткой промежуточных и конечных продуктов, а также освобождаемой в цикле энергии и определяет основную роль циклических превращений в клеточном метаболизме.

Очевидно, такой цикл можно рассматривать как «химическую машину», совершающую работу по превращению одних видов веществ и энергии в другие. Функционирование цикла по переработке поступающих из внешней среды продуктов и энергии можно представить на следующей схеме, где C_1, C_2, \dots, C_n — промежуточные компоненты цикла:



Строгий анализ показывает, что увеличение энтропии, сопровождающее внутренние процессы в этой химической машине, определяется измерением суммарного потенциала системы и внешней среды, взятым с обратным знаком, и равно

$$Td_i S = -d(G + G^*), \quad (\text{V. 4. 13})$$

где G — термодинамический потенциал системы, а G^* — термодинамический потенциал внешней среды, за счет поступления продуктов из которой «работает» химический цикл.

После совершения одного оборота цикла через время τ система вновь вернется в первоначальное состояние, а следовательно, через время τ измене-

ние значения ее термодинамического потенциала будет равно нулю: $\Delta G_T = 0$. Ясно, что при этом для внешней среды $\Delta G_T^* \neq 0$, так как именно за счет взаимодействия с внешней средой и совершился оборот цикла с произведенной им за это время работой.

Если величина τ достаточно мала, то скорость продуцирования энтропии, или диссипации энергии, в единицу времени будет равна

$$\beta = T \frac{d_i S}{dt} = -\frac{\Delta G^*}{\tau}. \quad (\text{V. 4. 14})$$

Полученное выражение позволяет сравнивать между собой различные циклы в отношении их энергетической эффективности. В самом деле, пусть имеются две системы, для которых $\Delta G^*_1 = \Delta G^*_2$. Очевидно, что если $\tau_1 < \tau_2$, то из (V. 4. 14) следует, что $\beta_1 > \beta_2$. Иными словами, скорость диссипации энергии в первом цикле больше, чем во втором, при том же самом значении совершенной работы (Т. Мицуной, 1959).

Нельзя забывать об ограничениях, налагаемых при этом на систему в силу ее частично равновесного состояния и нахождения в области линейной термодинамики. Вместе с тем необходимо критически отнестись и к существующим попыткам объяснить направление эволюционного процесса в живых системах на основании развитых выше термодинамических представлений.

В этих работах постулируется, что эволюция живых систем идет в направлении уменьшения скорости диссипации энергии, так что более совершенные системы обладают и меньшей величиной β . В процессе эволюции живых систем происходило одновременно все большее усложнение совокупности биохимических реакций при сохранении неизменной физико-химической природы отдельных этапов взаимодействия веществ реагентов. Поэтому характерные времена τ_i отдельных стадий оставались неизменными, но, поскольку усложнение системы вызывало увеличение их общего числа, увеличивалось и общее время τ , необходимое для завершения полного биохимического цикла. В связи с этим делался вывод о том, что при одних и тех же величинах обменных потоков с внешней средой и полезной работы цикла более сложные системы характеризовались меньшей величиной рассеяния энергии β (см. (V. 4. 14)), а поэтому они должны быть более совершенными.

В изложенных представлениях прежде всего вызывает сомнение справедливость биологических предпосылок такой чисто энергетической трактовки при оценке эволюционного положения разных организмов. Очевидно, также невозможно свести изменение характера клеточного метаболизма в процессе эволюции к одному лишь увеличению числа отдельных стадий в биохимических превращениях.

Помимо этого, общее время биохимических превращений в цепи определяется, как было показано в гл. I, наиболее медленной из всех стадий и не зависит непосредственно от их числа.

Большое значение скорости диссипации энергии в энергодающих процессах само по себе не является указанием на общее несовершенство системы, если в последней могут возникнуть одновременно протекающие сопряженные процессы. Именно степень сопряжения энергетических процессов в значительной степени определяет и общую диссипацию энергии в системе и может так или иначе изменяться в процессе онтогенеза или эволюции, приводя к соответствующему изменению величины β . Наконец, кинетические схемы биохимических циклов не могут претендовать на полное отражение всех свойств целостной живой системы. Построенные на этой основе заключения относительно термодинамических свойств системы заранее будут носить ограниченный характер, не выходящий за рамки исходного кинетического описания отдельных сторон сетки метаболических реакций.

Глава VI

Термодинамика систем вдали от равновесия (нелинейная термодинамика)



§ 1. Общие критерии устойчивости стационарных состояний

Постановка проблемы. В предыдущих разделах были представлены методы вычисления скорости продуцирования энтропии в открытых системах и описано их применение в изучении свойств биологических объектов. Общее заключение, которое следует из приведенного материала, состоит в том, что хотя нахождение диссипативных функций β (V.3.1), (V.3.6) и имеет значение для энергетической характеристики реальные системы, однако определить на этой основе направление ее эволюции можно только в области линейной термодинамики, где справедливы соотношения (V.3.3), (V.3.5). Это обстоятельство, конечно, существенно ограничивает область применения термодинамики необратимых процессов в анализе свойств биологических систем, которые находятся вдали от термодинамического равновесия. Поэтому вдали от равновесия однозначных выводов о значениях величины β при приближении системы к стационарному состоянию сделать нельзя. Это особенно важно для биохимических превращений, где наиболее характерны реальные переходы с изменением значения термодинамического потенциала ΔG порядка 4—8 кДж/моль, в то время как применимость линейных соотношений в химических реакциях ограничена пределами изменения $\Delta G \approx 0,8$ кДж/моль и где, кроме того, существуют дополнительные кинетические ограничения.

Вместе с тем именно в области изучения механизмов регуляции существенно неравновесных процессов клеточного метаболизма были получены важные результаты на основе математического моделирования (см. гл. I—IV). Описание динамики биологических процессов с помощью дифференциальных уравнений основано на том, что в сущности эти процессы подчиняются законам химической кинетики (см. гл. I). Это означает, что эволюция системы, установление и свойства ее стационарных состояний определяются не статистическими закономерностями, а прежде всего кинетическим характером взаимодействия составных элементов.

Неравновесные кинетические системы построены по принципу химических машин, так что для них понятие энтропии в отличие от равновесных систем не имеет решающего значения для предсказания поведения во времени.

Динамические системы обладают ограниченным числом возможных состояний, достижение которых нельзя предсказать путем сравнения статистической упорядоченности начального и конечного состояний системы.

Следовательно, возможность и пути достижения того или иного конечного состояния определяются здесь начальными условиями и видом дифференциальных уравнений, если, конечно, они правильно отражают существующие в системе кинетические закономерности.

Вид траекторий в неравновесных системах может быть определен только

путем анализа исходной системы уравнений, равно как и характер особых стационарных точек (см. гл. I).

Распространение идей термодинамики на такие неравновесные динамические системы связано с решением основной проблемы: можно ли, зная кинетические параметры системы реакций, но исходя из термодинамических соображений, предсказать такие свойства стационарного состояния, как устойчивость или, наоборот, возможность самопроизвольного перехода в другой стационарный режим при небольших возмущениях, и найти условия установления стационарного колебательного режима?

Именно на эти вопросы, связанные с термодинамической характеристикой далеких от равновесия стационарных состояний, важнейших для существование открытых систем, и призвана ответить нелинейная термодинамика.

Критерии устойчивости. Основной смысл рассуждений при нахождении термодинамических критериев устойчивости стационарных состояний, далеких от равновесия, состоит в том, что при отклонении системы от устойчивого стационарного состояния в ней должны возникнуть силы, стремящиеся вернуть ее в первоначальное положение. Допустим, что в устойчивом стационарном состоянии значения скоростей и химического сродства были равны

$$v = \bar{v}; A = \bar{A}. \quad (\text{VI.1.1})$$

При небольшом возмущении значения v и A станут равными

$$v^* = \bar{v} + \delta v; A^* = \bar{A} + \delta A, \quad (\text{VI.1.2})$$

где v^* , A^* — значения в возмущенном состоянии; δv , δA — величины отклонения от стационарной точки по переменным v и A .

Строгое рассмотрение показывает, что в том случае, если начальное стационарное состояние было устойчивым, произведение величин (δv) и (δA) должно быть положительным. Это обозначается как

$$\beta[\delta S] = \delta v \delta A > 0. \quad (\text{VI.1.3})$$

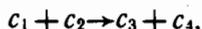
Величина $\beta[\delta S]$ в (VI.1.3) называется величиной избыточной продукции энтропии в возмущенном состоянии. Ее положительный характер соответствует тому, что система самопроизвольно возвращается из возмущенного состояния назад к первоначальному устойчивому стационарному положению.

Нарушение критерия (VI.1.3) означает, что исходное состояние не было устойчивым и поэтому, покинув его, система не вернется назад. Иными словами, если величина избыточной продукции энтропии отрицательна

$$\beta[\delta S] = \delta v \delta A < 0, \quad (\text{VI.1.4})$$

то возникшая в стационарном состоянии флуктуация будет «уводить» от него систему все дальше, что и означает его неустойчивый характер.

В качестве примера рассмотрим химическую реакцию второго порядка



где $c_1 > 0$, $c_2 > 0$, $c_3 > 0$, $c_4 > 0$ — концентрация реагентов.

Очевидно, скорость и сродство для нее имеют вид (см. (V.2.12), (V.2.13))

$$v = dc_1/dt = c_1 c_2;$$

$$A = -(-\mu_1 - \mu_2 + \mu_3 + \mu_4) = \ln \frac{c_1 c_2}{c_3 c_4},$$

где все константы скорости приняты равными единице, а $\mu_i = \mu_{0i} + RT \ln c_i$, где все μ_{0i} равны между собой. Найдем избыточную продукцию энтропии в условиях, когда система претерпевает флуктуацию δc_1 вблизи стационарного состояния, а c_2 , c_3 , c_4 остаются постоянными:

$$\delta v = c_2 \delta c_1; \delta A = \frac{1}{c_1} \delta c_1. \quad (\text{VI.1.5})$$

Тогда (VI.1.3) имеет вид

$$\beta[\delta S] = \frac{c_2}{c_1} (\delta c_1)^2 > 0. \quad (\text{VI.1.6})$$

Как видно, $\beta[\delta S]$ положительна при любых δc_1 , что соответствует устойчивости стационарного состояния. Наоборот, в автокаталитических реакциях может происходить нарушение условия (VI.1.3).

Рассмотрим, например, автокаталитическую реакцию образования c_1 :



Очевидно,

$$v = c_1 c_2; \quad A = \ln \frac{c_1 c_2}{c_1^2} = \ln \frac{c_2}{c_1}. \quad (\text{VI.1.8})$$

Для $\beta[\delta S]$ имеем следующее выражение:

$$\beta[\delta S] = (c_2 \delta c_1) \left(-\frac{1}{c_1} \delta c_1 \right) = -\frac{c_2}{c_1} (\delta c_1)^2 < 0. \quad (\text{VI.1.9})$$

Это и означает нарушение условия устойчивости в данной химической системе.

Критерии эволюции. Для критериев направления движения системы к стационарному состоянию, если последнее находится вдали от положения равновесия, не удастся получить в общем случае количественного выражения.

Как было показано, в области линейной термодинамики монотонное уменьшение скорости продуцирования энтропии в результате внутренних необратимых процессов (см. (V.4.7)) $d\beta \leq 0$ указывает на стремление системы к стационарной точке.

Направление эволюции определяется здесь характером изменения потенциальной функции β (аналогично во втором законе), значение которой в точке фазового пространства не зависит от начальных условий и пути перехода. Это означает, что переход системы к конечному стационарному состоянию эквивалентен движению вдоль траекторий, нормальных к эквипотенциальным поверхностям:

$$\beta(X_1, X_2, \dots, X_n) = \text{const.}$$

Полный дифференциал $d\beta = d(\sum_k J_k X_k)$ имеет вид

$$d\beta = d_x \beta + d_j \beta, \quad (\text{VI.1.10})$$

где слагаемые

$$d_x \beta = \sum_k J_k dX_k; \quad (\text{VI.1.11})$$

$$d_j \beta = \sum_k X_k dJ_k \quad (\text{VI.1.12})$$

обусловлены изменением сил и потоков соответственно. Когда система находится вблизи от равновесия, то в силу (V.3.4) и (V.3.5) $\frac{1}{2} d\beta = d_x \beta = d_j \beta$, т. е. каждое из слагаемых $d_j \beta$ и $d_x \beta$ также является полным дифференциалом. Это означает, что величину $2d_x \beta = d\beta$ можно рассматривать в качестве элементарной работы, производимой в единицу времени по перемещению системы к конечному состоянию. Однако вдали от равновесия, когда соотношения Онзагера не выполняются, $d_x \beta$ уже не есть полный дифференциал и, следовательно, изменения этой величины зависят от пути перехода и не могут служить однозначным критерием эволюции системы. Тем не менее и вдали от равновесия общий характер изменения $d_x \beta$ состоит в уменьшении этой величины, что записывается в виде

$$d_x \beta \leq 0, \quad (\text{VI.1.13})$$

где знак равенства соответствует достижению стационарного состояния, после чего уже не происходит дальнейших изменений $d_x \beta (d_x \beta_{\text{стационар}} = 0)$.

Если $d_x \beta$ зависит не более чем от двух переменных (A_1, A_2), то возможно введение интегрирующего множителя λ , превращающего $T d_x \beta$ в полный дифференциал $dD(A_1, A_2)$ переменных A_1, A_2 :

$$dD = T d_x \beta.$$

В случае химических процессов соответствующее выражение для dD имеет вид

$$dD = v dA = T d_x \beta \leq 0, \quad (\text{VI.1.14})$$

где $D = D(A)$, $v(A) = dD/dA$, A — химическое средство.

Выражение (VI.1.14) означает, что $D(A)$ и есть потенциальная функция, значение которой все время уменьшается: $dD/dt \leq 0$, а в стационарном состоянии

$$\bar{v}(A) = dD/dA = 0.$$

Очевидно, в устойчивом стационарном состоянии D минимально, т. е. $d^2 D/dA^2 > 0$.

Функция $D(A)$ называется кинетическим потенциалом или потенциалом скоростей. Вблизи равновесия выражение (VI.1.14) совпадает с (V.4.7), а D совпадает со скоростью продуцирования энтропии β . Как видно, эволюционный критерий (см. (VI.1.13)) применим вдали от равновесия только в случае одной-двух переменных (v_1, A_1, v_2, A_2). Кроме того, так же как и вблизи равновесия, таким способом невозможно описать периодические явления вблизи стационарной точки. В частности, выражение (VI.1.14) не описывает колебательные процессы, предельные циклы, точки типа «центр», а также движения системы вблизи точки типа «фокус».

Рассмотрим в качестве примера химической системы, далекой от равновесия, реакцию



где $P > 0$, $Q > 0$ — постоянные; c_1, c_2 — переменные концентрации.

Уравнения кинетики мономолекулярных реакций в простейшем случае, где все константы равны единице, имеют вид

$$J_1 = P - c_1; \quad J_2 = c_1 - c_2; \quad J_3 = c_2 - Q \quad (\text{VI.1.16})$$

или

$$\dot{c}_1 = v_1 - v_2 = P - 2c_1 + c_2, \quad (\text{VI.1.17})$$

$$\dot{c}_2 = v_2 - v_3 = c_1 + 2c_2 + Q.$$

Значения c_1, c_2 при $\bar{v}_1 = \bar{v}_2 = \bar{v}_3$ составляют

$$\bar{c}_1 = (Q + 2P)/3; \quad \bar{c}_2 = (2Q + P)/3. \quad (\text{VI.1.18})$$

Вначале определим тип устойчивости особой точки (\bar{c}_1, \bar{c}_2) . На основании (I.3.11) легко найти, что в линейном приближении

$$c_1 = \bar{c}_1 + \xi; \quad c_2 = \bar{c}_2 + \eta,$$

а дифференциальные уравнения (VI.1.17) имеют вид

$$\dot{\xi} = -2\xi + \eta + \dots; \quad \dot{\eta} = \xi - 2\eta + \dots \quad (\text{VI.1.19})$$

Характеристическое уравнение (I.3.16) для определения показателя ω в решениях вида $\xi = \alpha_1 e^{\omega t}$, $\eta = \alpha_2 e^{\omega t}$ имеет вид

$$\begin{vmatrix} -2-\omega & 1 \\ 1 & -2-\omega \end{vmatrix} = 0 \quad (\text{VI.1.20})$$

или

$$\omega_2 + 4\omega + 3 = 0.$$

Отсюда следует $\omega_1 = -1$, $\omega_2 = -3$, что обуславливает тип особой стационарной точки «устойчивый узел» и монотонный характер приближения к ней системы. Посмотрим, в какой степени результаты термодинамического и математического анализа совпадают друг с другом. Величины сродства реакций с точностью до постоянных RT и при равенстве между собой всех μ_0 запишутся в виде

$$A_1 = \ln \frac{P}{c_1}, \quad A_2 = \ln \frac{c_1}{c_2}, \quad A_3 = \ln \frac{c_2}{Q}. \quad (\text{VI.1.21})$$

Вначале применим эволюционный критерий (VI.1.13). Вычисления $d_{\chi}\beta$ показывают, что

$$\begin{aligned} d_{\chi}\beta &= (P - c_1) d \ln \frac{P}{c_1} + (c_1 - c_2) d \ln \frac{c_1}{c_2} + (c_2 - Q) d \ln \frac{c_2}{Q} = \\ &= \left(\frac{c_1 - P}{c_1} - \frac{c_2 - c_1}{c_1} \right) dc_1 + \\ &+ \left(\frac{c_2 - c_1}{c_2} - \frac{Q - c_2}{c_2} \right) dc_2 \leq 0. \end{aligned} \quad (\text{VI.1.22})$$

Легко убедиться в том, что $d_{\chi}\beta$ в данном случае не является полным дифференциалом ($d_{\chi}\beta \neq dD$), а следовательно, потенциальной функции $D = D(c_1, c_2)$ не существует. В самом деле, если бы $d_{\chi}\beta = dD$, то это означало бы, что

$$\begin{aligned} \frac{\partial D}{\partial c_1} &= \frac{c_1 - P}{c_1} - \frac{c_2 - c_1}{c_1}; \\ \frac{\partial D}{\partial c_1} &= \frac{c_2 - c_1}{c_2} - \frac{Q - c_2}{c_2}, \end{aligned}$$

причем одновременно должно было бы устанавливаться равенство смешанных производных

$$\frac{\partial^2 D}{\partial c_1 \partial c_2} = -\frac{1}{c_2} \text{ и } \frac{\partial^2 D}{\partial c_2 \partial c_1} = -\frac{1}{c_1}.$$

Однако в действительности это не имеет места, поскольку из (VI.1.18) следует, что $c_1 \neq c_2$, а следовательно,

$$\frac{\partial^2 D}{\partial c_1 \partial c_2} = -\frac{1}{c_2} \neq -\frac{1}{c_1} = \frac{\partial^2 D}{\partial c_2 \partial c_1}. \quad (\text{VI.1.23})$$

Однако вблизи равновесия, когда суммарное сродство в системе (VI.1.15) близко к нулю, $A = \ln P/Q \sim 0$ и величины P и Q должны быть близки между собой: $P \approx Q$. Отсюда следует, что и стационарные значения c_1 и c_2 равны: $c_1 = c_2 = P$. Следовательно, в этом случае существует и потенциал скоростей dD , т. е. $d_{\chi}\beta = dD$ приобретает свойства полного дифференциала, поскольку теперь в (VI.1.23)

$$\frac{\partial^2 D}{\partial c_1 \partial c_2} = \frac{\partial^2 D}{\partial c_2 \partial c_1} = -\frac{1}{P}.$$

Теперь обратимся к термодинамическому критерию (VI.1.3) устойчивости стационарного состояния

$$\begin{aligned} \beta[\delta S] &= \delta v_1 \delta A_1 + \delta v_2 \delta A_2 + \delta v_3 \delta A_3 = \\ &= \frac{2}{c_1} (\delta c_1)^2 + \frac{2}{c_2} (\delta c_2)^2 - \left(\frac{1}{c_1} + \frac{1}{c_2} \right) (\delta c_1) (\delta c_2). \end{aligned} \quad (\text{VI.1.24})$$

Подстановка \bar{c}_1 и \bar{c}_2 из (VI.1.18) показывает, что $\beta[\delta S] > 0$ при любых δc_1 и δc_2 . Аналогичный результат получается и вблизи равновесия, когда $c_1 = c_2 = P$. Следовательно, независимо от степени удаленности системы (VI.1.15) от положения равновесия ($P = Q$) стационарное состояние в ней всегда будет устойчивым.

§ 2. Термодинамика нелинейных кинетических систем

В гл. I подробно изложены различные типы устойчивости стационарных состояний и переходы между ними. Интересно сравнить изменение характера устойчивости системы с изменением ее термодинамических свойств при соответствующем изменении параметров системы.

В качестве изменяющегося параметра, носящего общий характер, целесообразно выбрать значение химического сродства или пропорциональную ему величину, которые характеризовали бы удаленность системы от положения равновесия.

Действительно (см. § 1), вблизи равновесия невозможны периодические процессы, и, следовательно, устойчивое стационарное состояние в системах, находящихся в области линейной термодинамики, будет характеризоваться особой точкой типа «устойчивый узел», для которой $\omega < 0$. Пусть наша модель представляет собой систему дифференциальных уравнений

$$dx/dt = P(x, y, \alpha); \quad dy/dt = Q(x, y, \alpha), \quad (\text{VI.2.1})$$

где α — параметр, характеризующий удаленность от положения равновесия. При изменении α будут соответствующим образом изменяться значения коэффициентов характеристического уравнения. А это, в свою очередь, может привести не только к изменению координат особой точки «устойчивый узел», но и к изменению самого типа устойчивости стационарного состояния, если при этом система покинет область устойчивых узлов (рис. VI.1). Переходы между областями (I—V) устойчивости особых точек можно сопоставить с изменением значения параметра α . Это удобно сделать с помощью графика, на котором по оси ординат отложены значения координат стационарной точки x , а по оси абсцисс — значения параметра α , измеряющего степень удаления от равновесия (рис. VI.2).

При дальнейшем удалении от точки равновесия $\alpha = \alpha_0$ мы можем выйти за пределы применимости термодинамики, оставаясь, однако, все еще на термодинамической ветви. Тогда необходимо использовать критерий устойчивости стационарных состояний (VI.1.3) по положительному характеру избыточной продукции энтропии. Согласно этому критерию, все состояния на термодинамическом участке I кривой $x(\alpha)$ устойчивы:

$$\beta[\delta S] > 0; \quad |\alpha_0| < |\alpha| < |\alpha^*|. \quad (\text{VI.2.2})$$

Потеря устойчивости и переход на так называемую нетермодинамическую ветвь происходят при $\alpha = \alpha^*$, когда избыток продукции энтропии становится отрицательным:

$$\beta[\delta S] < 0; \quad |\alpha| > |\alpha^*|. \quad (\text{VI.2.3})$$

Бифуркационная точка $\alpha = \alpha^*$ соответствует термодинамическому порогу

появления неустойчивостей. В этой точке система находится на границе устойчивости, а величина избыточной продукции энтропии обращается в нуль:

$$\beta[\delta S]=0; |\alpha|=|\alpha^*|. \quad (\text{VI.2.4})$$

В свою очередь, на нетермодинамической ветви в области неустойчивых стационарных состояний свойства системы зависят от вида дифференциальных уравнений, описывающих ее поведение при значениях параметров за точкой бифуркации.

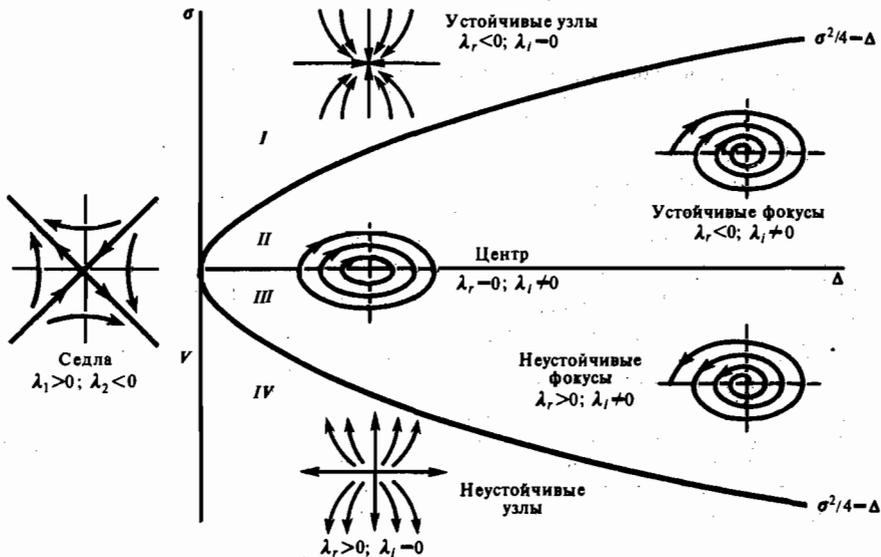


Рис. VI.1.

Диаграмма типа устойчивости особых точек системы линейных дифференциальных уравнений $dx/dt = ax + by$; $dy/dt = cx + dy$

Диаграмма получается путем линеаризации системы уравнений:

$$\text{Здесь } a = \left. \frac{\partial P}{\partial x} \right|_{\bar{x}, \bar{y}}; b = \left. \frac{\partial P}{\partial y} \right|_{\bar{x}, \bar{y}}; c = \left. \frac{\partial Q}{\partial x} \right|_{\bar{x}, \bar{y}}; d = \left. \frac{\partial Q}{\partial y} \right|_{\bar{x}, \bar{y}}.$$

Тип устойчивости зависит от величины характеристических чисел $\lambda_{1,2}$ — решений характеристического уравнения системы (см. гл. I):

$$\lambda_{1,2} = \frac{1}{2} \left[(a+d) \pm \sqrt{(a+d)^2 - (ad-bc)} \right].$$

Диаграмма представлена в координатах σ , Δ : $\sigma = a+d$, $\Delta = ad-bc$; λ_r — действительная часть, λ_i — мнимая часть характеристического числа; I—V—области, в которых сохраняется тип устойчивости решения. Устойчивые точки характеризуются отрицательной действительной частью ($\lambda_r < 0$) и располагаются в областях I и II ($\sigma > 0$, $\Delta > 0$), которые разделены кривой $\sigma^2/4 = \Delta$. Для точек в области I, кроме того, $\sigma^2/4 > 0$ и, следовательно, $\lambda_i = 0$. Область I соответствует устойчивым узлам. Наоборот, в области II $\sigma^2/4 < 0$, т. е. $\lambda_i \neq 0$. Это область соответствует устойчивым фокусам. Неустойчивые фокусы и неустойчивые узлы расположены соответственно в областях III и IV ($\lambda_r > 0$), также разделенных кривой $\sigma^2/4 = \Delta$. На полуоси $\sigma = 0$, $\Delta = 0$ расположены точки типа «центр», для которых $\lambda_r = 0$, $\lambda_i \neq 0$ и $\lambda_{1,2} = \pm i\lambda$. Область V соответствует особым точкам типа «седло». Здесь $\lambda_i = 0$, а λ_r имеет разные знаки ($\lambda_1 > 0$, $\lambda_2 < 0$)

Возникающая неустойчивость обязана своим появлением термодинамической флуктуации (VI.2.3), которая может быть причиной распада системы. Однако гораздо более интересен случай, когда появление неустойчивости приводит к появлению нового состояния системы, которое стабилизируется во времени и пространстве. Один из примеров этого был приведен в гл. III и представляет собой образование предельного цикла в системе, обладающей особой точкой

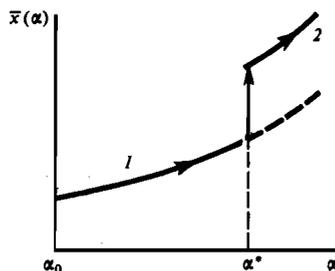
типа «неустойчивый фокус». Орбитальная устойчивость такой системы и означает существование стабилизированного во времени определенного типа изменения концентрации реагентов, поддержание которого достигается за счет непрерывного обмена с окружающей средой энергией и веществом.

Рассмотрим возможные переходы из области *I* устойчивых узлов (см. рис. VI.1), которые система может совершать при изменении параметра α . Очевидно, из области *I* возможны два типа переходов: 1) с потерей устойчивости при переходе в область «седел» *V*, когда на границе устойчивости один из дейст-

Рис. VI.2.

Зависимость стационарной концентрации компонента \bar{x} от параметра α

Пусть при удалении от равновесия α увеличивается. Допустим, что в начальный момент времени $\alpha = \alpha_0$, что соответствует стационарной точке «устойчивый узел» (область *I* на рис. VI.1) системы (VI.2.1). При увеличении α получается некая ветвь стационарных состояний $\bar{x} = \bar{x}(\alpha)$, которая будет устойчивой, т. е. включать устойчивые стационарные точки до тех пор (участок *I* кривой), пока α не достигнет в конечном итоге бифуркационного значения α^* . При значении $\alpha = \alpha^*$ система теряет устойчивость, а на диаграмме (см. рис. VI.1) это означает переход из области *I* в одну из неустойчивых областей *III* или *V*. При дальнейшем увеличении α движение пойдет вдоль неустойчивой ветви (участок *2* кривой $\bar{x}(\alpha)$), где также возможны переходы между областями неустойчивости. Основной критический пункт достигается, таким образом, при бифуркационном значении $\alpha = \alpha^*$, когда система теряет устойчивость. С точки зрения развитых выше термодинамических представлений, стационарные состояния, расположенные на участке *I* кривой при малых $\alpha = \alpha_0$, устойчивы в силу теоремы о минимуме скорости продуцирования энтропии



вительных корней обращается в нуль; 2) в область устойчивых фокусов *II*, где корни становятся комплексно-сопряженными числами. Ясно, что переход $I \rightarrow V$ с потерей общей устойчивости $\lambda_2 < 0$, $\lambda_1 > 0$ должен сопровождаться и нарушением термодинамических условий стационарных состояний. Он может произойти поэтому за точкой бифуркации $\alpha = \alpha^*$ и сопряжен с переходом системы на нетермодинамическую ветвь. Наоборот, переход $I \rightarrow II$ не приводит к потере устойчивости стационарных состояний, но сопряжен с нарушением условия монотонности (апериодичности) релаксационных процессов приближения системы к стационарному положению. Следовательно, при увеличении α переходы с нарушением условия апериодичности могут происходить при $|\alpha| < |\alpha^*|$ до достижения точки бифуркации α^* , т. е. совершаться на термодинамической ветви без нарушения критерия устойчивости (VI.2.2). При дальнейшем увеличении α может уже произойти потеря устойчивости в точке α^* и переход в область *III* неустойчивых фокусов.

Таким образом, при увеличении α может нарушиться либо вначале условие апериодичности при сохранении общей стабильности, либо, наоборот, сразу условие устойчивости стационарного состояния с переходом на нетермодинамическую ветвь.

В § 4 гл. II было показано, что реагенты часто неоднородно распределяются в пространстве, так что происходит одновременная диффузия веществ от одной точки к другой внутри системы, а колебания концентраций реагентов в нелинейных реакциях будут определенным образом распределены в пространстве. В результате возникает новая диссипативная структура с пространственно неоднородным распределением вещества. Это следствие взаимодействия процесса диффузии, стремящейся привести состав системы к однородности, и локальных процессов изменений концентраций в ходе кинетических нелинейных реакций.

Возникновению этой диссипативной структуры также предшествуют нарушение условий термодинамической устойчивости вдали от равновесия в точке бифуркации (α^*) и переход в неустойчивое состояние на нетермодинамическую ветвь. Аналогичным образом можно сопоставить триггерные свойства в системах, обладающих S-образными характеристиками, с изменением потенциальной функции $d_x \beta = dD$. В описанных триггерных системах (см. § 1 гл. II) происходят скачкообразные переходы между двумя устойчивыми состояниями при изменении управляющего параметра α .

В этих системах имеется всего одна независимая переменная. Это значит, что применение эволюционного критерия (VI.1.13) $d_x \beta \leq 0$ возможно в форме полного дифференциала (VI.1.14):

$$dD = T d_x \beta = v dA, \quad (\text{VI.2.5})$$

где v , A — переменные величины ($v = v(x)$ — скорость реакции, $A(x)$ — ее средство, x — переменная концентрация реагента). Если сравнить свойства кинетического потенциала D с математическими критериями устойчивости стационарных состояний, то системе соответствует исходное дифференциальное уравнение общего вида

$$v = dx/dt = f(x, \alpha), \quad (\text{VI.2.6})$$

где α — параметр. Стационарные значения $\bar{x} = \bar{x}(\alpha)$ находят из уравнения $v = f(x, \alpha) = 0$.

Поскольку изменения x происходят в открытой системе, в правой части (VI.2.6) должны существовать члены, описывающие приток из внешней среды и отток во внешнюю среду вещества x :

$$v = f(x, \alpha) = f_1(x) - f_2(x). \quad (\text{VI.2.7})$$

Если принять, что во внешней среде концентрации источника (Q_1) и конечного продукта (Q_2) превращения x , выходящего из системы, остаются постоянными, средство реакций обмена с внешней средой выразится как

$$A_1 = \ln \frac{Q_1}{x} \quad (\text{VI.2.8})$$

для поступления $f_1(x)$ и

$$A_2 = \ln \frac{x}{Q_2} \quad (\text{VI.2.9})$$

для оттока $[-f_2(x)]$ вещества x . Очевидно, величины dA_1 и dA_2 выразятся как

$$dA_1 = -\frac{1}{x} dx; \quad dA_2 = \frac{1}{x} dx. \quad (\text{VI.2.10})$$

Тогда общее изменение кинетического потенциала dD примет вид

$$dD = f_1(x, \alpha) dA_1 - f_2(x, \alpha) dA_2, \quad (\text{VI.2.11})$$

или с учетом соотношений (VI.2.10) и (VI.1.7),

$$dD = -\frac{1}{x} f_1(x, \alpha) dx + \frac{1}{x} f_2(x, \alpha) dx, \quad dD = -\frac{1}{x} f(x, \alpha) dx. \quad (\text{VI.2.12})$$

Найдем значение потенциала D в стационарных точках, расположенных на ветвях S-образной кривой стационарных состояний. Очевидно,

$$dD/dx = -f(x, \alpha)/x. \quad (\text{VI.2.13})$$

Найдем вторую производную d^2D/dx^2 в некоторой стационарной точке $\bar{x} = \bar{x}(\alpha)$:

$$d^2D/dx^2 = -[f'_x(x, \alpha)/x^2 - f(x, \alpha)/x^2]_{\bar{x}} \quad (\text{VI.2.14})$$

Так как второй член в квадратных скобках (VI.2.14) в стационарной точке $x(\alpha)$ обращается в нуль, а $x(\alpha) > 0$ по смыслу задачи, то знак

$$\left(\frac{d^2 D}{dx^2}\right)_x = -f'_x(\bar{x}, \alpha) / \bar{x}(\alpha) \quad (\text{VI.2.15})$$

противоположен знаку производной правой части (VI.2.6) в стационарной точке $\bar{x}(\alpha)$:

$$\text{sign} (D''_{xx})_{\bar{x}} = -\text{sign} [f'_x(\bar{x}, \alpha)]. \quad (\text{VI.2.16})$$

Согласно эволюционному термодинамическому критерию (VI.1.16), потенциальная функция $D(x)$ принимает минимальное значение, при этом ее вторая производная положительна в устойчивом стационарном состоянии. В этом же случае, согласно (VI.2.16), знак первой производной правой части (VI.2.6) в стационарной точке отрицателен, но, согласно математическому критерию, это и означает устойчивый характер стационарного состояния. Наоборот, в неустойчивых стационарных состояниях потенциал D принимает максимальное значение, его вторая производная отрицательна, а знак первой производной $f'(x, \alpha)$ в точке $x(\alpha)$ положителен.

Во всех точках верхней и нижней ветвей S-образных кривых значения производных правых частей соответствующих дифференциальных уравнений отрицательны, а для промежуточного участка — положительны. Таким образом, термодинамические критерии устойчивости стационарного состояния совпадают с соответствующими математическими признаками.

С термодинамической точки зрения, кинетический потенциал в устойчивых стационарных точках принимает минимальные значения, а скачкообразные самопроизвольные переходы в системе между устойчивыми стационарными состояниями происходят, когда два состояния обладают одинаковым значением потенциала. Можно считать поэтому, что эти переходы связаны с преодолением потенциального барьера, как схематически показано на рис. VI.3.

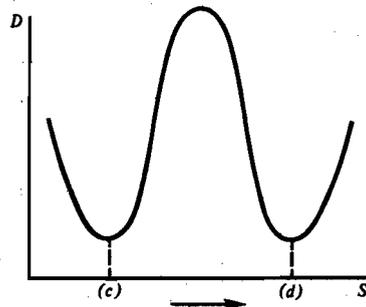


Рис. VI.3. Изменение кинетического потенциала (D) при переходе между устойчивыми стационарными состояниями (c и d)

§ 3. Энтропия, информация и биологическая упорядоченность

Общие выводы. В гл. V—VI изложены основные положения феноменологической термодинамики необратимых процессов, главным образом в применении к анализу химических реакций или к таким изменениям в открытых системах, для которых можно использовать понятие скорости реакции и химического потенциала. Важно подчеркнуть, что попытки применить такой подход для анализа отдельных процессов метаболизма, а общих свойств целостных биологических систем встречает ряд принципиальных трудностей.

В самом деле, вычисление диссипативных функций непосредственно основано на уравнениях кинетики, которые дают значения скоростей и движущих сил процессов.

Однако имеющиеся математические модели биологических систем с использованием дифференциальных уравнений (см. гл. I—IV) могут отразить отдельные стороны клеточного метаболизма, но не описывают всей совокупности

сложных реакций, лежащих в основе важнейших биологических процессов роста, развития, адаптации к внешним воздействиям, эволюции.

Выше был рассмотрен критерий устойчивости стационарного состояния в виде положительного характера величины избыточной продукции энтропии при небольшом возмущении системы

$$\beta[\delta S] = \delta A \delta v > 0.$$

Отрицательный характер этой величины указывает на неустойчивость стационарной (особой) точки. Вблизи равновесия критерий устойчивости $\beta[\delta S] > 0$ совпадает с теоремой о минимуме продуцирования энтропии в стационарном состоянии. Что касается термодинамических критериев эволюции открытых систем, то эта задача решена только для состояний, близких к равновесию. Именно в этой области монотонное уменьшение скорости продуцирования энтропии $d\beta/dt < 0$ и служит критерием самопроизвольного стремления к устойчивому стационарному состоянию.

Вблизи равновесия, где $J_i = \sum L_{ik} X_k$, $L_{ik} = L_{ki}$, $L_{ii} > 0$, функция

$$\beta = \sum_i J_i X_i = \sum_{i,k} L_{ik} X_i X_k$$

приобретает свойства полного дифференциала и является потенциальной функцией, так что $d\beta/2 = d_x \beta = d_i \beta = dD$.

Как было показано (см. § 4, гл. V), это означает, что вблизи состояния равновесия невозможны периодические явления и, в частности, отсутствуют особые точки типа «фокус» или автоколебательные стационарные режимы.

Необходимость поисков каких-то новых критериев направления или оптимальности функционирования биологических систем, основанных на понимании особенностей их внутреннего строения и жизнедеятельности, является важной проблемой биофизики. Одна из таких попыток связана с постулированием того, что оптимальная самонастройка метаболических процессов происходит в направлении максимально возможного в данных условиях энергетического сопряжения реакций. Это выражается в минимальном значении скорости уменьшения свободной энергии dF/dt за счет определенной согласованности метаболических процессов, а не в результате уменьшения скорости продуцирования энтропии по теореме Пригожина. Иными словами, предполагают, что в процессе эволюции биологических систем выжили только те из них, которые обладали типом метаболизма, обеспечивающим максимально возможное в данных условиях значение свободной энергии F системы. Однако данное заключение в общем виде не может считаться доказанным.

Изменение сложной системы включает различные масштабы времени, соответствующие разным процессам, начиная с небольших характерных времен быстрых взаимодействий составных элементов и кончая большими эволюционными временами (см. § 3 гл. II). На существовании разных масштабов времени в пределах одной большой системы, в сущности, основан и постулат о разделении изменения энтропии открытой частично равновесной системы на две независимые части: $dS = d_e S + d_i S$. Именно роль медленных переменных проявляется в процессах обмена с окружающей средой, а быстрые процессы представляют собой внутренние необратимые изменения. Это же обстоятельство фактически лежит в основе теоремы о минимуме скорости продуцирования энтропии в стационарном состоянии.

Действительно, возможность установления стационарного режима лишь для одного из двух сопряженных уравнений Онзагера $J_1 = 0$, $J_2 \neq 0$, $J_1 = L_{11} X_1 + L_{12} X_2$, $J_2 = L_{21} X_1 + L_{22} X_2$ может осуществляться, если в исходной кинетической схеме ему соответствует некое дифференциальное уравнение, описывающее изменение скорости быстрой переменной. Другой процесс ($J_2 \neq 0$) соответствует

медленно меняющейся переменной, которая является практически постоянной в пределах времени установления стационарного состояния по быстрой переменной. Это равносильно предположению о расслоении всей системы на две подсистемы с быстрыми и медленными переменными, т. е. предположению о двух масштабах времени. Разделение переменных на быстрые и медленные, позволяющее сократить в математических моделях исходное число дифференциальных уравнений (см. гл. III), термодинамически соответствует переводу подсистемы быстрых переменных в стационарное состояние, в котором скорость продуцирования энтропии минимальна.

В далеких от равновесия системах может также осуществляться расслоение на быстрые и медленные переменные. Однако теорема Пригожина о минимуме скорости продуцирования энтропии там неприменима, так же как и не существуют величины, имеющие характер потенциала.

Существенно новой проблемой является построение термодинамики комплексов активных молекул переносчиков, представляющих собой «молекулярные машины» со статистическими и механическими степенями свободы (см. § 2 гл. IV). Очевидно, скорости процессов переноса и трансформации энергии в таких системах зависят от конкретных молекулярно-кинетических механизмов кооперативных взаимодействий внутри каждого комплекса, а не от общего числа переносчиков в системе. Поэтому в общем случае выражения для сил (химические потенциалы) и потоков в комплексах молекул-переносчиков не совпадают с обычными выражениями, применяемыми в случае подвижных переносчиков.

Все эти проблемы интенсивно разрабатывают в современной биофизике. Они требуют развития новых физических понятий и моделей, где учитывались бы взаимодействие механических (детерминистских) и статистических степеней свободы и их вклад в процессы переноса и трансформации энергии в биологических системах.

Проблема устойчивости. Указанная особенность биологической организации вызывает трудности в использовании термодинамики в биологии и обуславливает сложность самого понятия устойчивости в применении к биологическим системам. Эта проблема касается сопоставления общих принципов механики и статистической физики и в целом выходит за рамки настоящего учебника.

Кратко говоря, в основе статистического поведения системы, состоящей из многих частиц, лежит неустойчивость их механических траекторий. Небольшие по величине случайные возмущения приводят к столь сильным отклонениям, что вид траектории отдельной частицы уже не определяется начальными условиями. В таких неустойчивых процессах исчезающе малая «причина» может привести к «большому» следствию. В результате в системе наступает состояние глобальной неустойчивости механических состояний отдельных частиц, в силу чего система в целом становится статистической, а траектории отдельных частиц — практически непредсказуемыми. В противоположность этому в реальных системах могут наблюдаться только устойчивые решения любой динамической задачи. С точки зрения статистического подхода, динамическое решение является флуктуацией, а развитие неустойчивости при разрушении решения — релаксацией флуктуации. Одновременное наличие в системе статистических и детерминистских свойств тождественно разделению степеней свободы на сильно неустойчивые и устойчивые. Например, для сосуда с газом по относительно устойчивым степеням система очень далека от термодинамического равновесия (стенки сосуда), а статистические свойства определяются неустойчивыми степенями свободы (молекулы газа).

Неустойчивые степени определяют число возможных различных состояний, которыми может быть осуществлено данное макроскопическое состояние. Имен-

но с числом этих микросостояний, или статистическим весом (W), и связана энтропия системы. Согласно формуле Больцмана, энтропия определяется как логарифм статистического веса:

$$S = k_B \ln W, \quad (\text{VI.3.1})$$

где k_B — постоянная Больцмана, равная $1,38 \cdot 10^{-16}$ эрг·град $^{-1}$ или $3,31 \cdot 10^{-24}$ энтропийных единиц ($1 \text{ э. е.} = 1 \text{ кал} \cdot \text{град}^{-1} = 4,2 \text{ Дж/К}$), или $1,36 \cdot 10^{-23}$ Дж/К.

В полностью устойчивых системах реализуется только единственное динамическое решение. Поэтому и число способов, или микросостояний, которыми осуществляется единственное макросостояние, равно единице ($W=1$), а следовательно, энтропия равна нулю. В реальных системах энтропия характеризует неустойчивые степени свободы, а именно к ним применимо это понятие. В этом случае говорят о термодинамическом равновесии по неустойчивым степеням свободы. Однако по детерминистским (механическим) степеням свободы система не находится в состоянии термодинамического равновесия. Строго говоря, применять понятие энтропии можно лишь к тем степеням свободы, по которым развивается неустойчивость за время наблюдения за системой. Стабильные степени свободы не дают вклада в статистический вес системы и не учитываются в ее общей энтропии. С этой точки зрения, твердые стенки сосуда с газом — гигантская термодинамическая флуктуация, релаксирующая за время существования сосуда, т. е. за время, много большее времени наблюдения за системой.

Использование понятия энтропии для существенно неравновесных и гетерогенных систем оправдано только по отношению к выделенным статистическим степеням свободы. Именно поэтому характеризовать в целом поведение биологической системы с помощью понятия энтропии неправильно. Его можно применять только по отношению к конкретным метаболическим процессам. Пренебрежение этим обстоятельством создает причины серьезных ошибок при попытках дать чисто термодинамическую трактовку жизненных явлений. В этом плане следует рассматривать и проблему биологической информации.

Связь энтропии и биологической информации. Связь этих понятий раскрывается по мере изучения информационных процессов в биологии. Как известно, на всех уровнях биологической организации существуют информационные системы, в которых производится, запасается, передается, перерабатывается и воспринимается информация. Когда исследователь получает информацию о действительном состоянии системы, то первоначальная неопределенность, которой характеризовались его знания о системе, уменьшается. Очевидно, количество полученной информации в этой ситуации будет тем больше, чем больше была исходная неопределенность в состоянии системы. Пусть число микросостояний, которыми можно осуществить данную систему, равно W , а вероятность каждого из них равна $p=1/W$.

Допустим, что в простейшем случае мы получаем сообщение о единственном и реальном состоянии системы. Количество информации I , содержащееся в этом сообщении, будет равно, согласно теории информации,

$$I = -\log_2 p = \log_2 W. \quad (\text{VI.3.2})$$

За единицу количества информации (бит) принимается информация, содержащаяся в достоверном сообщении, когда число исходных возможных состояний равно $W=2$ (априорная вероятность события равна $p=1/2$), т. е.

$$I = \log_2 2 = 1 \text{ бит}. \quad (\text{VI.3.3})$$

Такое количество информации содержится, например, в сообщении о том, на какую сторону упала при бросании в воздух монета. Аналогично, информация о том, какая из 64 клеток шахматной доски занята, содержит

$$I = \log_2 64 = 6 \text{ бит}.$$

Сопоставление формул (VI.3.2) и (VI.3.1) устанавливает связь между энтропией и информацией:

$$S(\text{э. е.}) = 2,3 \cdot 10^{-24} I \text{ бит.}$$

Следовательно, одна энтропийная единица (4,2 Дж/К) соответствует $2 \cdot 10^{-24}$ бит, или 1 бит информации эквивалентен $k_B \ln 2 = 10^{-24}$ Дж/К. Величина энтропии, выраженная в битах, составит $\bar{S} \approx S(k_B \ln 2)^{-1}$, где S — физическая энтропия, выраженная в энтропийных единицах.

Совпадение (с точностью до множителя) выражений для энтропии и информации имеет глубокий смысл: энтропия системы и информация о системе являются взаимосвязанными. Полагают, что энтропия есть недостающая информация для полного описания системы или информация есть недостающая энтропия, т. е. разность между максимально возможной энтропией системы и той энтропией, которой на самом деле обладает система, что выясняется после получения о ней информации.

Формулы (VI.3.1) и (VI.3.2) свидетельствуют о том, что формально величины I и S идентичны. Считают, что эквивалентность I (бит) и S (Дж/К) в некотором смысле подобна эквивалентности массы и энергии по закону Эйнштейна $E = mc^2$.

Это соотношение между энтропией и информацией было выявлено Бриллюэном и сформулировано в виде негэнтропийного принципа информации. Однако сказанное справедливо лишь по отношению к микроинформации, т. е. информации о реализации в данный момент одного из возможных микросостояний системы. Микроинформация в принципе не может быть «запомнена», поскольку любое из микросостояний скоро переходит в другое из-за сильной неустойчивости микроскопических движений (тепловые флуктуации). Реально в биологии, так же как и в технике, системой запоминается макроинформация, свойства которой будут описаны ниже. Здесь необходимо лишь отметить, что макроинформация не связана с физической энтропией соотношением Бриллюэна.

Формула (VI.3.2) получена для упрощенной ситуации, когда может произойти W равновероятных событий. В более общем случае, когда исходно имеется N событий с набором вероятностей p_1, p_2, \dots, p_N количество информации, соответствующей этой ситуации, равно

$$I = - \sum_{j=1}^N p_j \log_2 p_j. \quad (\text{VI.3.4})$$

Выражения (VI.3.1) и (VI.3.4) были получены К. Шенноном для оценки абсолютного количества информации при передаче сообщения о событии, которое априори может произойти с некоторой вероятностью.

Количество биологической информации. Используя формулы теории информации, можно оценить, какое количество информации содержится в организме, составными элементами которого являются отдельные клетки (Л. А. Блюменфельд, 1974). В теле человека содержится $\sim 10^{13}$ клеток. Будем считать, что все они уникальны и их нельзя менять местами без нарушения целостности организма. Априори число способов, которым может быть осуществлена эта структура, составит $W = 10^{13}!$, а количество информации, необходимое для ее построения,

$$I = \log_2(10^{13}!) \sim 10^{13} \log_2 10^{13} \sim 4 \cdot 10^{14} \text{ бит.}$$

Понижение энтропии при построении упорядоченного организма человека из системы хаотически расположенных $10^{13}!$ клеток составит

$$\Delta S = 2,3 \cdot 10^{-24} \cdot 4 \cdot 10^{14} \sim 10^{-9} \text{ э. е.} \sim 4 \cdot 10^{-9} \text{ Дж/К.}$$

Количество необходимой информации увеличится, если учесть уникальность расположения аминокислотных остатков в белках ($3 \cdot 10^{25}$ остатков/150 г ДНК) в теле взрослого человека. Тогда общее количество информации, соответствующее их регулярному расположению, составит $I = 1,3 \cdot 10^{26}$ бит, что эквивалентно понижению энтропии на $\Delta S = 300$ э. е. ~ 1200 Дж/К.

Это понижение энтропии при возникновении сложнейшей биологической организации — организма человека — на самом деле незначительно. По величине оно равно, например, уменьшению энтропии при конденсации 170 см^3 паров воды. В процессах метаболизма понижение ΔS на 300 э. е. с легкостью может компенсироваться увеличением энтропии при окислении 900 г глюкозы.

Таким образом, формальное применение выражения (VI.3.2) показывает, что степень упорядоченности и, следовательно, количество информации, содержащееся в биологических системах, мало и не превышает таковую в твердом теле той же массы.

Ценность информации. До сих пор в предыдущих рассуждениях не учитывали структурный характер организации живого, считая, что упорядоченность элементов имеет одинаковое значение во всей системе для ее построения. Однако на разных уровнях организации живого ценность информации, закодированной в биологических структурах, может быть различной.

Увеличение сложности биологической системы происходит за счет увеличения числа разнородных элементов системы и связей между ними. Если на данном уровне возрастает незаменимость элементов системы, то это означает увеличение ценности содержащейся в нем информации. Согласно М. В. Волькенштейну, на данном уровне ценностью обладает лишь избыточная информация, связанная с незаменимыми элементами. Избыточная информация — это повторная информация, которая играет роль, уменьшая вероятность разрушения ценной информации шумом при ее передаче. С этой точки зрения, аperiodическая система содержит значительно большее количество незаменимых элементов, а следовательно, большее количество ценной избыточной информации, чем эквивалентная периодическая система, где элементы взаимозаменяемы.

Ценность информации можно определить по степени избыточности, или незаменимости, сообщения. Например, количество информации, закодированной последовательностью из общего типа n нуклеотидов (аденин, гуанин, тимин, цитозин), в цепи ДНК равно

$$I_1 = \log_2 4^n = 2n \text{ бит.}$$

Однако на следующем уровне в белковой цепи количество содержащейся информации уменьшается по сравнению с уровнем ДНК. В самом деле, каждый из 20 аминокислотных остатков кодируется тремя нуклеотидами, так что количество информации в синтезированной на n нуклеотидах белковой цепи равно

$$I_2 = \log_2 20^{n/3} = 1,44n \text{ бит.}$$

Таким образом, первоначальное количество информации низшего уровня (ДНК) уменьшается на более высоком уровне (белок). В данном случае это обусловлено вырождением триплетного кода, когда один и тот же аминокислотный остаток кодируется разными кодонами: общее число кодонов $4^3 = 64$ больше числа аминокислот (20). На следующем уровне возможны замены некоторых аминокислот другими без изменения свойств белка. Тем самым количество действительно незаменимых аминокислот уменьшается ($N < 20$), а количество информации I_3 на этом уровне соответственно падает:

$$I_3 = \log_2 n^{n/3} < \log_2 20^{n/3}, \quad I_3 < I_2.$$

Так, на участке ДНК из 600 нуклеотидов заключена информация $I_{\text{ДНК}} = \log_2 4^{600} = 1200$ бит, а информация в первичной последовательности белка ($I_{\text{Б}}$), синтезированной на этом участке и содержащей 200 аминокислот, уже меньше и составляет $I_{\text{Б}} = \log_2 20^{200} = 860$ бит.

Разница $\Delta I = I_{\text{ДНК}} - I_{\text{Б}} = 340$ бит является избыточной и самостоятельной ценности не представляет. Таким образом, на каждом следующем уровне количество необходимой информации уменьшается. Отсюда следует, что на более высоких уровнях организации возрастает ценность содержащейся в их элементах информации по сравнению с первоначальной информацией низшего уровня. Это уменьшение информации 1-го низшего уровня можно заменить уменьшением числа элементов следующего уровня. Тем самым ценность элемента информационного сообщения на более высоком уровне повышается по сравнению с низшим, что может быть определено как повышение степени незаменимости этого элемента.

Рецепция и возниконовение информации. Результаты приведенных расчетов, основанных на представлениях теории информации, подтверждают сделанный выше вывод о том, что специфика информационных процессов в биологии определяется не повышенной информационной емкостью молекулярных структур, а особенностями самих информационных процессов. Речь идет о характеристиках процессов рецепций, запоминания и передачи информации другим акцепторным системам организма.

Основным условием восприятия информации является способность рецепторной системы переходить в одно из возможных устойчивых состояний вследствие полученной информации. Иными словами, информационная система должна быть мультистационарной, а число устойчивых стационарных состояний N определяет информационную емкость системы, т. е. максимальное количество информации I_{max} которое система может акцептировать:

$$I_{\text{max}} = \log_2 N. \quad (\text{VI.3.5})$$

Принципиальное различие формул (VI.3.5) и (VI.3.3) состоит в том, что в (VI.3.2) характеристика микросостояний W включает мгновенные значения координат и импульсов всех атомов системы. Информация, связанная с W , называется микроинформацией I^{mic} , и именно для нее выполняется принцип Бриллюэна эквивалентности информации и физической энтропии:

$$\tilde{S}_{\text{max}} = I_{\text{max}}^{\text{mic}} = \log_2 W; \quad \tilde{S} + I^{\text{mic}} = \tilde{S}_{\text{max}} = I_{\text{max}}^{\text{mic}} \quad (\text{VI.3.6})$$

где $\tilde{S} = S (k \ln 2)^{-1}$ — энтропия, выраженная в битах (VI.3.1). В такой системе, однако, информация не может запоминаться и храниться сколько-нибудь длительное время, поскольку, попав в любое из микросостояний, система тут же выйдет из него в результате неустойчивости.

Между тем в биологии особую важность приобретает запоминание и хранение информации в молекулярных системах, обладающих микроскопическими размерами, где при нормальных температурах тепловые флуктуации вызывают неустойчивость микроскопических движений. Поэтому для рецепции, запоминания и хранения информации необходимо произвести определенную работу, за счет которой система перейдет в одно из устойчивых состояний, потеряв часть энергии в процессах диссипации. В результате затраты энергии повысится энтропия всей системы на величину, превышающую количество запомненной информации. Таким образом, информационные системы обладают диссипативными свойствами, за счет которых происходит переход на выделенные детерминистские степени свободы, сохраняющие свои значения в течение длительного времени. Именно здесь и осуществляется превращение микроинформа-

ции (I^{mic}) в макроинформацию (I^{mac}), которую система запоминает и затем может передать другим акцепторным системам. В реальных информационных системах характерное время запоминания зависит от их конструкции, температуры и свободной энергии.

Рассмотрим в качестве простого примера поведение перемешивающихся шаров в корзине, используемой в лотерее. В корзине сделано несколько лунок, и выигрыш определяется шаром, попавшим случайно в одну из них. Физическая энтропия в этой системе связана только с быстро релаксирующими степенями свободы, а их поведение определяется шарами в корзине и не зависит от того, находится ли шар в лунке или нет. Однако количество информации равно нулю, если лунки пустые, и равно I_{max} если определенный шар лежит в лунке. Рецепция информации возникает при попадании шара в определенную лунку. Это требует затраты работы (ΔE), которая сопровождается переходом энергии в теплоту, что и делает рецепцию необратимой. Физическая энтропия системы увеличивается на величину $\Delta E/T$, превышающую возникшую информацию $\Delta E/T \gg I_{\text{max}}$. Время запоминания здесь определяется временем нахождения шара в лунке. Ясно, что при достаточной глубине лунки шар не может выйти из нее за счет тепловых флуктуаций.

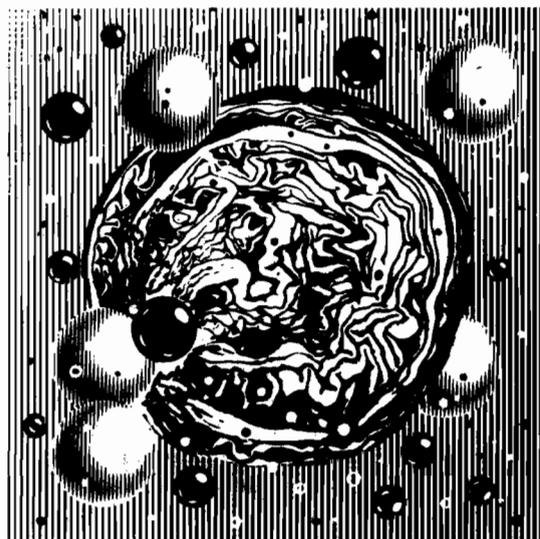
В молекулярных системах ситуация должна быть аналогичной. Так, сохранение определенной последовательности нуклеотидов (I^{ma}) зависит прежде всего от химической стабильности молекулы ДНК. Информационная емкость определяется количеством определенных комбинаций нуклеотидов, а не числом микросостояний, включающих колебания всех атомов цепочки ДНК. Само образование макроинформации здесь сопряжено с работой и затратой энергии в процессе биосинтеза молекулы ДНК. Точно так же реализация этой информации возможна при затрате энергии в процессах трансляции и синтеза белковой цепи.

Таким образом, информационная система должна включать статистическую и динамическую подсистемы. С ними соответственно связаны физическая энтропия как мера множества незапоминаемых системой микросостояний и макроинформация как мера множества тех состояний, о пребывании в которых система должна помнить.

Само возникновение информации носит случайный характер (номер лунки, комбинация нуклеотидов). Однако, возникнув в системе, случайная информация запоминается и тем самым может приобрести ценность и смысл. Принцип запоминания «случайного выбора» (Г. Кастлер) лежит в основе возникновения биологической информации. Именно рецепция и использование содержащейся в биополимерах информации в реальных биологических процессах придают ей биологическую ценность и определяют роль биологической упорядоченности и организации. В свою очередь, организм может отбирать ценную информацию из внешней среды, необходимую для его жизнедеятельности. Это достигается за счет соответствующего устройства рецепторных систем, которые пропускают только «ценную» информацию и предотвращают ненужные ответные реакции организма, не пропуская информацию, лишенную для него ценности.

Часть вторая
Молекулярная биофизика

III
**Пространственная
организация биополимеров**



VII
Пространственные конфигурации полимерных молекул

VIII
Различные типы взаимодействий
в макромолекулах

IX
Конформационная энергия
и пространственная организация биополимеров

Основу структурной организации живого составляют макромолекулы, прежде всего важнейшие биополимеры — белки и нуклеиновые кислоты. Специфика полимерных молекул в отличие от малых молекул определяется большим числом однотипных звеньев (мономеров), связанных в линейную цепь. Тепловое движение входящих в полимерную цепь атомов и атомных групп, повороты и вращение их вокруг единичных связей обуславливают большое число внутренних степеней свободы макромолекулы. Это заставляет рассматривать макромолекулы как макроскопическую систему, статистический характер поведения которой проявляется в наличии средних значений таких параметров, как размеры, форма, степень свернутости макромолекулы. Вместе с тем существующие между атомами химические связи и взаимодействия ближнего и дальнего порядка накладывают определенные ограничения на число возможных конформаций макромолекул. Изменения конформации биополимеров, происходящие в процессах клеточного метаболизма и трансформации энергии, также носят вполне определенный характер и отражают внутримолекулярную динамическую организацию биополимеров. Таким образом, своеобразие биологической макромолекулы как физического объекта заключается в тесном сочетании статистических и детерминистских (механических) особенностей ее поведения: с одной стороны, большое число взаимодействующих атомов и внутримолекулярных степеней свободы и, как следствие, возможность осуществления огромного числа разных конформаций, с другой — определенный химический характер и конформационные изменения при функционировании биополимеров.

В макромолекулах происходят сложные процессы трансформации энергии, включающие миграцию энергии электронного возбуждения и транспорт электронов. В основе функционирования макромолекул лежат электронно-конформационные взаимодействия (ЭКВ), которые проявляются в самых различных процессах, где участвуют биологически активные макромолекулярные комплексы.

Основная проблема заключается в том, чтобы раскрыть природу взаимодействий атомных групп, определяющих конформационные особенности и внутреннюю динамику биологических макромолекул, механизмы взаимодействия электронных и конформационных переходов, и на этой основе понять механизмы функционирования биополимеров в живых системах. Именно это и составляет предмет молекулярной биофизики.

Глава VII

Пространственные конфигурации полимерных молекул



§ 1. Статистический характер организации полимеров

Каждое макросостояние полимера характеризуется определенными значениями молекулярных параметров и может быть осуществлено большим количеством микросостояний или конформаций. Тепловое движение и вращение вокруг единичных связей, составляющих полимерную цепь атомов, должны приводить к значительной свернутости цепи и образованию клубка. Такой клубок обладает целым набором большого числа конформаций, которые цепь может принимать в процессе микроброуновского движения ее частей. Здесь употребляется термин «конформация» в «микросмысле». Он означает определенное с точностью до амплитуд валентных колебаний расположение атомов в полимере. Ясно, что взаимозависимость теплового движения звеньев будет наиболее сильно проявляться у соседних звеньев и ослабляться по мере увеличения расстояния между ними.

Свободно-сочлененная цепь. Будем считать, что полимерная цепь состоит из ряда прямолинейных сегментов, каждый из которых включает определенное число отдельных звеньев. Внутри каждого сегмента сохраняется абсолютная корреляция в ориентации звеньев, но зато между сегментами эта корреляция полностью отсутствует. Начало и конец модельной цепи совпадают, конечно, с таковыми для реальной цепи. Такая модельная цепь, состоящая из отдельных сегментов, взаимно независимых в отношении своей ориентации в пространстве, называется свободно-сочлененной (рис. VII.1).

Разбиение реальной цепи на статистические сегменты должно происходить так, чтобы число звеньев m , входящих в состав сегмента, было достаточно большим для обеспечения независимой ориентации сегментов. С другой стороны, число сегментов N , равное $N = n/m$, где n — полное число звеньев в цепи, не должно быть мало ($N \geq 10$), иначе становится невозможным статистическое рассмотрение поведения свободно-сочлененной цепи. Статистические свойства последней удобнее всего рассмотреть на примере определения среднего расстояния между концами цепи (рис. VII.1). Очевидно, для абсолютно вытянутой нити, состоящей из сегментов, каждый из которых характеризуется вектором l_i ($i = 1, 2, \dots, N$), радиус-вектор h между концами цепи равен

$$h = \sum_{i=1}^N l_i \quad (\text{VII.1.1})$$

Реальная длинная цепная молекула принимает огромное число конфигураций, так что h может иметь, вообще говоря, любые значения в диапазоне от $h=0$ (концы цепи совпали) до $h=Nl$ ($l=|l_i|$ вытянутая цепь). Ясно, что в клубке эти разные значения h принимаются с разной вероятностью. Вероятность того, что определенный сегмент находится в определенном положении относительно другого сегмента, может быть выражена через функцию распределения W_a вектора расстояния между сегментами цепи.

Функция W_a называется функцией распределения величины a или плотностью вероятности нахождения данного значения a , если произведение $W_a da$ равно вероятности нахождения значения переменной a в интервале от a до $a + da$. Можно показать, что для очень длинной цепи функция распределения расстояния между концами является гауссовой.

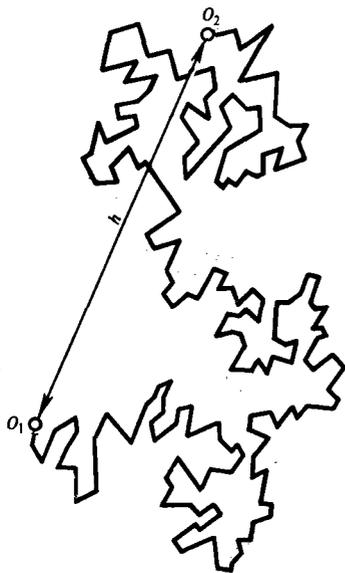


Рис. VII.1.
Свободно-сочлененная цепь ($O_1 - O_2$)
(по В. Н. Цветкову, В. Е. Эскину,
С. Я. Френкелю, 1964):
 h — расстояние между концами цепи

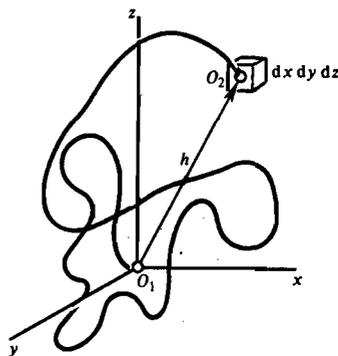


Рис. VII.2.
К выводу функции распределения величины h для свободно-сочлененной цепи (объяснение см. в тексте)
(по В. Н. Цветкову, В. Е. Эскину,
С. Я. Френкелю, 1964)

Длина вектора h равна

$$h = (x^2 + y^2 + z^2)^{1/2}$$

где x, y, z — проекции h на оси координат (рис. VII.2). Функции распределения координат x, y, z конца цепи являются гауссовыми и имеют вид

$$\begin{aligned} W_x &= \left(\frac{3}{2\pi Nl^2} \right)^{1/2} e^{-3x^2/(2Nl^2)}; \\ W_y &= \left(\frac{3}{2\pi Nl^2} \right)^{1/2} e^{-3y^2/(2Nl^2)}; \\ W_z &= \left(\frac{3}{2\pi Nl^2} \right)^{1/2} e^{-3z^2/(2Nl^2)}. \end{aligned} \quad (\text{VII.1.2})$$

Так как переменные x, y, z являются независимыми случайными величинами, то вероятность попадания конца цепи в элемент объема $d\tau = dx dy dz$ в окрестности точки (x, y, z) равна произведению вероятностей трех независимых событий, или

$$W_\tau d\tau = \left(\frac{3}{2\pi Nl^2} \right)^{3/2} e^{-3h^2/(2Nl^2)} d\tau, \quad (\text{VII.1.3})$$

где $h^2 = x^2 + y^2 + z^2$.

Для ансамбля систем из n молекул произведения $W_{\tau} dt$ равно относительному числу dn/n молекул, конец которых попадает в элемент объема dt при закреплении начала всех цепей в точке O_1 . Очевидно, что средняя величина вектора \mathbf{h} равна нулю, так как все его направления в пространстве равновероятны

Рис. VII. 3.

График функции распределения W_h (по В. Н. Цветкову, В. Е. Эскину, С. Ф. Френкелю, 1964)

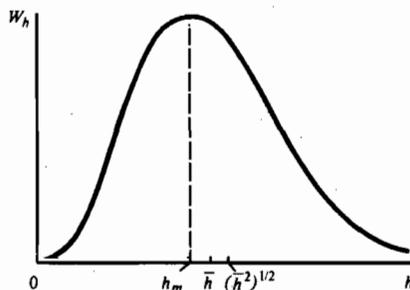
Найдем среднее значение W_h и среднеквадратичное $(\bar{h}^2)^{1/2}$ значение h :

$$\bar{h} = (1/n) \int_0^{\infty} h dn = \int_0^{\infty} h W_h dh = \sqrt{[8/(3\pi)] N l^2};$$

$$\bar{h}^2 = (1/n) \int_0^{\infty} h^2 dn = \int_0^{\infty} h^2 W_h dh = N l^2;$$

$$(\bar{h}^2)^{1/2} = \sqrt{N l^2}.$$

Величина $R = (\bar{h}^2)^{1/2}$ характеризует средние размеры клубка, которые пропорциональны корню квадратному из числа его сегментов



при закреплении начала молекулы в начале координат. Вероятность того, что вектор \mathbf{h} имеет длину h , не зависит от направления \mathbf{h} и, очевидно, пропорциональна произведению W_{τ} на объем шарового слоя $4\pi h^2 dh$, в котором находятся концы всех векторов длиной от h до $(h + dh)$:

$$W_h dh = W_{\tau} 4\pi h^2 dh = \frac{4h^2}{\sqrt{\pi}} \left(\frac{3h^2}{2Nl^2} \right)^{3/2} e^{-3h^2/(2Nl^2)} dh. \quad (\text{VII.1.4})$$

Произведение $W_h dh$ равно относительному числу молекул dn/n , для которых длина вектора \mathbf{h} заключена в интервале от h до $(h + dh)$ (рис. VII.3).

Распределение (VII.1.3) может быть представлено в следующем виде:

$$W_{\tau} dh = \left(\frac{3}{2\pi \bar{h}^2} \right)^{3/2} \exp[-3h^2/(2\bar{h}^2)] d\tau. \quad (\text{VII.1.5})$$

В полимерной цепи, где все валентные углы фиксированы и одинаковы, а вокруг всех ординарных связей разрешено свободное вращение (рис. VII.4), для h^2 имеем при $N \gg 1$

$$\bar{h}^2 = N l^2 \frac{1 + \cos \theta}{1 - \cos \theta} \quad (\text{VII.1.6})$$

причем при фиксированных валентных углах остается в силе распределение (VII.1.5).

Гибкость полимера. Сворачивание гибкой цепи в клубок определяется ее термодинамической гибкостью: чем больше гибкость, тем меньше \bar{h}^2 при заданных N и l . В растворе наиболее вероятная конформация полимера — свернутый клубок, в котором энтропия системы максимальна. При растяжении полимера происходит разворачивание клубка и уменьшение числа возможных конформаций, что сопровождается уменьшением энтропии.

Энтропия S , соответствующая расстоянию h между концами цепи, определяется формулой

$$S = k_B \ln W_r(h) = l - 3k_B h^2 / (2Nl^2), \quad (\text{VII.1.7})$$

где $W_r(h)$ задается согласно (VII.1.5). Отсюда сила, необходимая для расчленения полимерной цепи, равна

$$f = -T \left(\frac{\partial S}{\partial h} \right)_T = \frac{3k_B T}{Nl^2} h. \quad (\text{VII.1.8})$$

Таким образом, возникновение упругой силы носит энтропийный характер, а сама она пропорциональна абсолютной температуре. Набухание отдельной

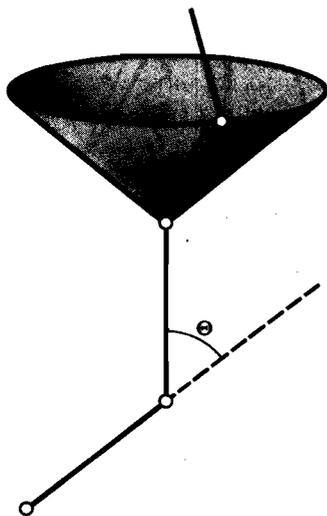


Рис. VII.4.
Цепь с фиксированными валентными углами (по М. В. Волькенштейну, 1975)

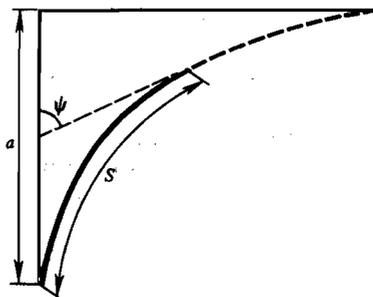


Рис. VII.5.
Червеобразная цепь с непрерывной кривизной (по В. Н. Цветкову, В. Е. Эскинну, С. Я. Френкелю, 1964):
 a — персистентная длина, ψ — угол между касательными к двум участкам цепи, разделенным достаточно большой длиной S

макромолекулы в растворе в результате проникновения растворителя внутрь клубка, подобно растяжению каучука, также переводит ее в менее вероятную конформацию. Возникающая при этом упругая сила энтропийной природы в конце концов приводит к тому, что набухание прекращается.

Описанное явление лежит в основе эластичности полимеров типа каучука. Высокая эластичность каучука имеет в основном энтропийную природу. При растяжении каучука изменение свободной энергии $dF = dU - TdS$ приводит к возникновению упругой силы f и требует работы, пропорциональной величине растяжения dL и, следовательно, равной $dF = fdL$. Отсюда

$$f = \left(\frac{dF}{dL} \right)_T \approx -T \left(\frac{dS}{dL} \right)_T \quad (\text{VII.1.9})$$

так как внутренняя энергия каучука в первом приближении не зависит от деформации, т. е. $\left(\frac{dU}{dL} \right)_T \approx 0$. Значение производной энергии в формуле (VII.1.9) может быть рассчитано аналогично тому, как это было сделано выше для отдельной полимерной цепи.

Персистентная длина. Отклонения от гауссовой статистики могут наступать при небольшом числе, меньшем 20—50, связей в полимерной цепи и молекулярных массах в несколько сотен единиц. Однако известны полимеры (ДНК в форме двойной спирали, спиральные полипептиды — производные целлюлозы), в которых даже при молекулярных массах в несколько сотен тысяч цепь не подчиняется гауссовой статистике, а длина сегмента цепи существенно увеличивается. Такие жесткие молекулы моделируются червеобразной цепью, у которой в пределе среднее значение угла Θ между звеньями стремится к 0 при уменьшении длины звена $l \rightarrow 0$, а цепь имеет непрерывную кривизну (рис. VII.5). Среднее значение $\cos \psi$ между касательными к двум участкам цепи, разделенным достаточно большой длиной s вдоль нити, убывает экспоненциально с ростом s :

$$\cos \psi(s) \sim \exp(-s/a), \quad (\text{VII.1.10})$$

где a — персистентная длина. Из (VII.1.10) видно, что косинус угла между касательными к цепи, разделенными длиной a вдоль цепи ($s=a$), уменьшается в e раз. Короткий по сравнению с a участок цепи ведет себя как твердый стержень, а разные сегменты длиной a вращаются практически независимо друг от друга. Для червеобразной цепи среднеквадратичное расстояние связано с ее персистентной длиной:

$$\bar{h}^2 = 2a^2 \left(\frac{L}{a} - 1 + e^{-L/a} \right), \quad (\text{VII.1.11})$$

где L — контурная длина цепи.

При бесконечно жесткой цепи (жесткий стержень) $a \rightarrow \infty$ и $\bar{h}^2 \simeq L^2$. Напротив, в случае гибкого стержня $a \ll L$ образуется обычный гауссовый клубок, где $\bar{h}^2 = 2aL$.

Для молекулы ДНК, представляющей собой жесткий полимер, персистентная длина составляет 50—60 нм, что намного больше, чем у большинства обычных гибких полимерных молекул. Жесткость ДНК определяется взаимодействием плоских ароматических колец: пар оснований, расположенных стопкой вдоль оси спирали и соединенных сахарофосфатными связями.

Рассмотренные сравнительно простые модели, не учитывающие реальных сил взаимодействия между элементами цепи, позволяют тем не менее рассчитывать ряд макроскопических усредненных параметров и понять природу фундаментального свойства полимеров — гибкости. Такие характеристики, как высокоэластичность в блочном состоянии, ряд оптических и гидродинамических свойств индивидуальных макромолекул, могут быть описаны на этой основе.

§ 2. Объемные взаимодействия и переходы глобула — клубок в полимерных макромолекулах

Все взаимодействия между атомами независимо от их конкретной физической природы при формировании различных макромолекулярных структур и переходов между ними можно разделить на два типа: взаимодействия ближнего порядка между атомами соседних звеньев и дальние взаимодействия или объемные эффекты между атомами, которые хотя и отстоят по цепи далеко друг от друга, но случайно сблизились в пространстве в результате изгибания цепи.

Клубок и глобула. Рассмотрим однородную последовательность одинаковых звеньев вдоль единой цепи, или гомополимер (И. М. Лифшиц). Не конкретизируя физическую природу звеньев и их взаимодействий, зададим геометрические размеры гомополимера среднеквадратичным расстоянием \bar{h}^2 между его концами, а внутреннюю пространственную структуру — пространственным

распределением плотности звеньев $n(x)$. Вследствие объемных взаимодействий плотность числа звеньев в пространстве, занятом молекулой, может меняться от точки к точке. В полимерной нити вследствие взаимосвязи звеньев или линейной памяти изменение плотности в одной точке пространства связано с изменением плотности в другой точке, т. е. существует пространственная корреляция плотности. Если в макромолекуле полностью отсутствуют всякие объемные взаимодействия, то она не имеет достоверной пространственной структуры. В этом состоянии флуктуации плотности — порядка самой плотности. Такое состояние носит название клубка. Радиус корреляции (ξ) здесь того же порядка, что и размеры макромолекулы [$R = (\bar{n}^2)^{1/2}$]; $\xi \sim R$, где $R \sim lN^{1/2}$.

Наличие объемных взаимодействий может привести к осуществлению такого состояния, в котором флуктуации плотности малы по сравнению с самой плотностью. Такое плотное образование называется глобулой. В нем радиус корреляции флуктуаций плотности много меньше размеров макромолекулы: $\xi \ll R$, причем $R \sim N^{1/3}$. Глобула в отличие от клубка обладает определенной компактной пространственной структурой. Сердцевина большой глобулы пространственно однородна с постоянной концентрацией звеньев n_0 .

Условия существования клубка и глобулы. В каких же условиях образуются клубок и глобула? Вследствие объемных взаимодействий сблизившиеся участки могут либо притягиваться, либо отталкиваться друг от друга. Повышение температуры приводит к увеличению отталкивания между мономерами, понижение — способствует их взаимному притяжению. Существует температура, при которой отталкивание мономеров полностью компенсируется их взаимным притяжением. Эта температурная точка называется Θ -точкой или Θ -температурой. В Θ -точке объемные взаимодействия отсутствуют, и макромолекула представляет собой клубок с размерами $R \sim lN^{1/2}$, который очевидно, сохраняется и при повышении температуры $T > \Theta$. Однако в области $T > \Theta$ из-за увеличения сил отталкивания размеры клубка возрастают: $R > lN^{1/2}$. Таким образом,

$$\bar{R}^2 = \alpha(\bar{R}^2)_0, \quad (\text{VII.2.1})$$

где $(\bar{R}^2)_0$ вычислено без учета дальних объемных взаимодействий; α — коэффициент набухания макромолекулы; в области $T > \Theta$ $\alpha > 1$, а при $T = \Theta$ $\alpha = 1$.

В хороших растворителях притяжение атомов цепи и растворителя больше, чем между атомами цепи, что равносильно увеличению их взаимного отталкивания в таком растворителе (область $T > \Theta$; здесь $\alpha > 1$). Наоборот, в плохих растворителях взаимное притяжение звеньев полимера больше, чем их притяжение к молекулам растворителя (область $T < \Theta$; $\alpha < 1$). В области $T < \Theta$ в объемном взаимодействии преобладают силы притяжения, которые могут привести к конденсации полимерного клубка в плотную слабо флуктуирующую глобулу. Эта глобула стабилизируется самосогласованным сжимающим полем, обусловленным силами притяжения между мономерами.

Рассмотрим вначале полимерную цепь без объемных взаимодействий, но во внешнем сжимающем поле $\phi(x)$, которое отражает взаимодействие гомополимера с окружающей средой. Оно может представлять собой, например, пространственную неоднородность растворителя, наличие в нем поверхностей раздела фаз, инородных частиц. Однако для реальных растворов полимеров $\phi(x)$ может рассматриваться как самосогласованное поле, образованное всеми элементами системы. Оказывается, что глобула обладает дискретным спектром значений свободной энергии. Температура выше критической приводит к исчезновению дискретного спектра и глобулярного состояния, которое, следовательно, может быть сформировано внешним полем лишь при достаточно низких температурах. В такой глобуле концы цепи статистически независимы, т. е. радиус корреля-

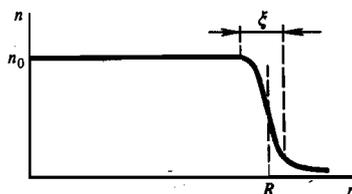
ции много меньше размеров макромолекулы, что и соответствует глобулярному состоянию цепи. В реальных макромолекулах объемные взаимодействия в отсутствие внешнего поля создают самосогласованное поле, приводящее к образованию глобулы. Характер распределения плотности в глобуле имеет вид, приведенный на рис. VII.6.

Рис. VII.6.

Распределение плотности звеньев в глобуле (по И. М. Лифшицу, А. Ю. Гроссбергу, А. Р. Хохлову, 1979):

$R_i \sim N^{1/3}$ — радиус глобулы, $R \ll lN^{1/2}$; N — число звеньев, l — длина звена, ξ — радиус корреляции звеньев в глобуле ($\xi \ll R$)

Профиль плотности для большой глобулы представляет собой «размытую ступеньку», а в ее сердцевине сохраняется некая постоянная концентрация звеньев n_0



Энергия взаимодействия звеньев. Таким образом, изменение температуры приводит к изменению размеров макромолекулы, что выражается в соответствующем изменении средней плотности числа мономерных звеньев, и, как следствие, к изменению энергии их взаимодействия. Отсюда ясно, что вклад сил притяжения и отталкивания в свободную энергию взаимодействия (F) звеньев зависит от числа n . При малом n свободная энергия взаимодействия может быть разложена в ряд по степеням n :

$$F = V k T (Bn^2 + Cn^3 + \dots), \tag{VII.2.2}$$

где V — объем системы; B и C — коэффициенты разложения, называемые вириальными коэффициентами (B — второй вириальный коэффициент, C — третий и т. д.). Очевидно, первое слагаемое в правой части равенства (VII.2.2), пропорциональное $\sim n^2$, описывает вклад парных столкновений звеньев, второе — вклад тройных и т. д. Если энергия притяжения при столкновениях велика по сравнению с $k T$, то силы притяжения сталкивающихся частиц играют наиболее важную роль, давая отрицательный вклад в общую энергию системы ($B < 0$). В результате макромолекула снижается относительно размеров идеального клубка. Обратная картина наблюдается, когда энергия притяжения меньше $k T$, а силы отталкивания дают в свободную энергию положительный вклад, вызывая набухание клубка ($B > 0$). В отсутствие объемных взаимодействий при Θ -температуре

$$B(\Theta) = 0, \tag{VII.2.3}$$

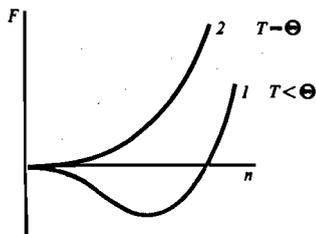


Рис. VII.7. Зависимость свободной энергии глобулы (1) и клубка (2) от плотности звеньев (по И. М. Лифшицу, А. Ю. Гроссбергу, А. Р. Хохлову, 1979)

случаю плохого растворителя соответствует условие $B < 0$, случаю хорошего растворителя с отталкивающими звеньями полимера соответствует $B > 0$. Типичный вид зависимости свободной энергии (глобулы) от n приведен на рис. VII.7 (кривая 1).

Этому графику (кривая 1) соответствуют, очевидно, отрицательное значение второго вириального коэффициента ($B < 0$) и положительное значение третьего ($C > 0$). Таким образом, в простейшем случае, когда $B < 0$, вклад отталкивания ($C > 0$) доминирует уже при столкновениях трех частиц. При изме-

нении температуры и других условий в растворе вириальные коэффициенты изменяются и, следовательно, меняется величина F .

Переходы клубок — глобула. Когда F перестает иметь минимум при отличных от нуля значениях n (рис. VII.7, кривая 2), глобула распадается и происходит переход глобула — клубок. Точке перехода соответствует условие $F=0$.

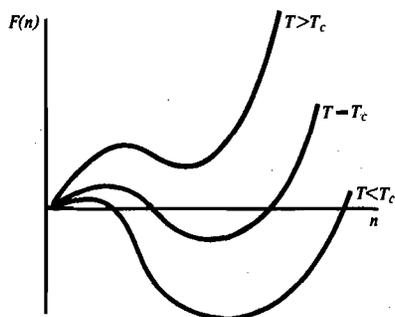


Рис. VII.8.

Пример зависимости свободной энергии от плотности в случае отрицательного значения третьего вириального коэффициента в θ -точке:

T_c — температура перехода клубок — глобула

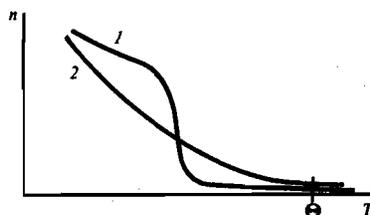


Рис. VII.9.

Температурная зависимость средней плотности в пределах макромолекулы в области перехода клубок — глобула (по И. М. Лифшицу, А. Ю. Гросбергу, А. Р. Хохлову, 1979):

1 — жесткая цепь. 2 — гибкая цепь

Переходы между состояниями клубка и глобулы — это переходы между разными фазами, что сопровождается изменением агрегатного состояния макромолекулы. Известно, что фазовые переходы первого рода происходят между двумя состояниями, каждое из которых стабильно по одну сторону от точки перехода и метастабильно по другую. Переход между ними при изменении внешнего параметра (температура) сопровождается тепловым эффектом (например, плавление льда и образование жидкой водной фазы).

Фазовые переходы второго рода происходят без тепловых эффектов, причем в области перехода существует лишь один минимум свободной энергии. При фазовых переходах первого рода энтропия и внутренняя энергия меняются скачком вследствие затраты конечной теплоты перехода и конечного изменения удельного объема системы. В точке перехода второго рода теплоемкость меняется скачком, энтропия и внутренняя энергия — непрерывно, а удельный объем системы не испытывает скачка. Примером фазовых превращений второго рода могут быть процессы перехода гелия в сверхтекучее состояние и металлов в сверхпроводящее состояние из ферромагнитного в парамагнитное в точке Кюри. Эти превращения связаны с кооперативным изменением направления ориентации спинов электронов в решетке металла от хаотического до параллельного при уменьшении температуры. При этом структура системы меняется непрерывно, а симметрия — скачком, т. е. новые магнитные свойства проявляются скачком. Фазовые переходы определены строго для случая, когда число частиц в системе $N \rightarrow \infty$. В реальных полимерах, где N — большое, но конечное число, существует конечная ширина температурного перехода (ΔT).

Конформационный переход является фазовым, если его ширина стремится к нулю: $\Delta T \rightarrow 0$ при $N \rightarrow \infty$.

На рис. VII.7 кривая 2 соответствует Θ -условиям, когда второй вириальный коэффициент обращается в нуль ($B=0$), а F становится положительной величиной. Таким образом, в этом приближении температура перехода T_c клубок—глобула совпадает с Θ -температурой. Вблизи точки перехода плотность падает; а сам переход идет непрерывно, как переход второго рода. Возможны, однако, и другие случаи, когда температура перехода клубок—глобула не совпадает с Θ -условиями. Например, если в Θ -точке $C < 0$, то зависимость $F(n)$ имеет вид, приведенный на рис. VII.8. Здесь переход клубок—глобула в точке $T = T_c$ происходит при $T_c > \Theta$ (кривая 2) и носит характер резкого перехода первого рода.

В целом показано (И. М. Лифшиц, А. Ю. Гросберг, А. Р. Хохлов), что в случае жесткой цепи переход клубок—глобула происходит как фазовый переход первого рода, хотя и с малой теплотой перехода. Конечный скачок плотности наблюдается несколько ниже Θ -точки, причем $(T_c - \Theta)/\Theta \sim 1/N^{1/2}$. В случае гибких цепей переход происходит как плавный переход второго рода, растянутый на всю Θ -область (рис. VII.9).

§ 3. Фазовые переходы в белках

Изложенные выше представления справедливы для гомополимеров, обладающих линейной памятью. Однако здесь еще не учитываются различная природа мономерных звеньев, что справедливо в случае гетерополимеров, а также специфика некоторых видов объемных взаимодействий в макромолекуле. Все эти вопросы будут освещены в последующих разделах, касающихся закономерностей конформационных превращений реальных биополимеров.

Рассмотрим кратко основные особенности структурных перестроек белков в процессе температурной денатурации и сопоставим их с изложенными выше результатами теории.

Температурная денатурация. Белковые глобулы претерпевают переходы типа порядок—беспорядок в относительно малом интервале возмущающей переменной (температура) и в этом смысле напоминают фазовые переходы первого рода. Простая термодинамическая трактовка температурных переходов биополимеров состоит в том, что денатурацию рассматривают как обычную мономолекулярную реакцию перехода из нативной формы (A) в денатурированную форму (B): $A \rightleftharpoons B$. В прямых калориметрических измерениях тепловых эффектов определяют изменение энтальпии, сопровождающее эти переходы. Простейшая термодинамическая интерпретация калориметрических данных основана на уравнении Кирхгофа зависимости энтальпии ΔH процесса от температуры:

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_p(T) dT, \quad (\text{VII.3.1})$$

где $C_p(T)$ —теплоемкость при постоянном давлении, зависящая от температуры; T_1, T_2 —пределы температурных изменений. В обычных измерениях к образцу, помещенному в калориметр, подводят теплоту с постоянной скоростью $dQ/dt = v_Q$ и регистрируют скорость повышения температуры образца: $dT/dt = v_T$. Теплоемкость C_p находят по формуле

$$C_p = \dot{v}_Q / v_T. \quad (\text{VII.3.2})$$

Чувствительность современных микрокалориметров такова, что они регистрируют изменение теплового потока до 10^{-7} Вт. На рис. VII.10 приведены типичные кривые изменения энтальпии ΔH и теплоемкости в области тепловой денатурации биополимеров. Весь температурный интервал (T_1, T_2) разделяет-

ся на две области: денатурационную (T_d, T_2) и неденатурационную (T_1, T_d). Внутри каждой из этих областей соотношение форм A и B меняется в каждой точке перехода в зависимости от температуры образца. В процессе тепловой денатурации происходит изменение теплоемкости биополимера при переходе его

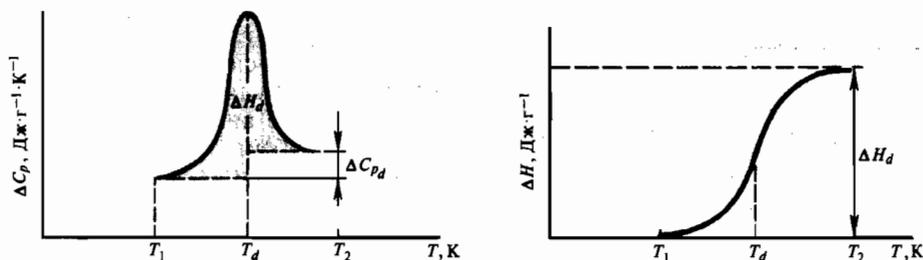


Рис. VII.10.

Изменение теплоемкости (ΔC_p) и энтальпии (ΔH) в области тепловой денатурации биополимеров (по Г. М. Мрвшлишвили, 1981):

T_1 — температура начала процесса плавления, T_d — температура максимума теплопоглощения («температура плавления»), T_2 — температура конца процесса плавления, ΔH_d — энтальпия плавления, $\Delta C_{p,d}$ — возможное изменение теплоемкости после тепловой денатурации

от нативного (спиральное, глобулярное) состояния в денатурированное (клубкообразное). Изменение энтальпии этого перехода вычисляется по формуле

$$\Delta H_{\text{ден}} = \int_{T_1}^{T_2} C_p dT - \int_{T_1}^{T_d} C_{p(\text{нат})} dT - \int_{T_d}^{T_2} C_{p(\text{ден})} dT = \Delta H_d - \int_{T_1}^{T_d} \Delta C_{p,d} dT, \quad (\text{VII.3.3})$$

где ΔH_d — молярная энтальпия перехода; T_d — температура перехода (максимум пика плавления); $C_{p(\text{нат})}$, $C_{p(\text{ден})}$, $\Delta C_{p,d}$ — теплоемкости биополимера в нативном, денатурированном состояниях и разность этих величин при температуре перехода T_d соответственно. Изменение энтропии в этом же процессе составляет

$$\Delta S_{\text{ден}} = \frac{\Delta H_d}{T_d} - \int_{T_1}^{T_d} \frac{\Delta C_{p,d}}{T} dT, \quad (\text{VII.3.4})$$

а свободная энергия Гиббса (ΔG) меняется как

$$\begin{aligned} \Delta G_{\text{ден}} &= \Delta H_{\text{ден}} - T_1 \Delta S_{\text{ден}}; \\ \Delta G_{\text{ден}} &= \Delta H_d \frac{T_d - T_1}{T_d} - \int_{T_1}^{T_d} \frac{T - T_1}{T} \Delta C_{p,d} dT. \end{aligned} \quad (\text{VII.3.5})$$

Связь со структурными изменениями. Из многочисленных экспериментальных данных следует, что денатурационное изменение удельной теплоемкости весьма существенно и в случае глобулярных белков $\Delta C_{p,d}$ может составлять 0,4—0,6 Дж·г⁻¹·К⁻¹, уменьшаясь, однако, до 0,25—0,3 Дж·г⁻¹·К⁻¹ для растворов ДНК и коллагена. Наблюдаемые изменения удельной теплоемкости могут быть вызваны, очевидно, термическим возбуждением внутримолекулярных степеней свободы в биополимерных цепях, что сопровождается также изменением энтропии. Однако сильные изменения $\Delta G_{p,d}$, которые по крайней мере на порядок больше соответствующих температурных изменений теплоемкостей малых

молекул, не могут быть объяснены только таким образом. В качестве дополнительного фактора называют изменение числа контактов гидрофобных групп белка с растворителем (о природе гидрофобных взаимодействий см. § 4 гл. IX).

В условиях сильных гидрофобных взаимодействий разрушение элементов вторичной структуры, погруженных в гидрофобное ядро, энергетически невыгодно. В силу этого изменение плотности в гидрофобном ядре возможно только при движениях участков вторичной структуры (α -спирали и β -«листы») как целого. Именно поэтому изменение плотности в гидрофобном ядре при денатурации не является локальным, а затрагивает, по существу, все гидрофобное ядро целиком со смещением элементов «структурного каркаса». Расширение молекулы вблизи нативного состояния происходит с сохранением грубых черт пространственной структуры. При этом оказывается; что на пути такого аффинного расширения возникает состояние, когда силы притяжения (ван-дер-ваальсовы, см. § 1 гл. VIII) уже сильно ослаблены, а соответствующее увеличение подвижности боковых групп еще не наступило (Е. М. Шахнович). Это приводит к тому, что денатурационный переход в белковой глобуле происходит со скачком объема, т. е. является внутримолекулярным фазовым переходом первого рода, связанным с нарушением плотной упаковки в ядре. На изменение структуры биополимера указывают также заметные изменения теплоемкости нативного белка в физиологической области температур задолго до регистрации главного денатурационного процесса.

Существенные тепловые перестройки макромолекулы с изменением температуры являются фактором, имеющим принципиальное значение в интерпретации температурных кривых перехода порядок—беспорядок в биополимерах. Действительно, если в процессе изменения теплоемкости в зависимости от температуры происходит изменение структуры макромолекулы, то общее изменение величин $\Delta H_{\text{ден}}$ и $\Delta S_{\text{ден}}$ должно включать в себя вклад от ΔH и ΔS , связанных с собственно процессом перестройки макромолекулы. Проводя измерения при разных температурах, исследователь, строго говоря, имеет дело с разными макромолекулярными структурами, для каждой из которых выполняются соотношения (VII.3.3) и (VII.3.4). Однако фактически измеренные значения ΔH , ΔS отражают не только температурную зависимость этих величин, а, скорее, сложные изменения конструкции самой системы. Влияние состава, pH растворителя на денатурационные кривые явно указывает на происходящие при этом химические нарушения, влияющие в итоге на микроструктуру белка в исходном состоянии.

Таким образом, статистическая картина фазовых переходов усложняется вследствие наложения структурных перестроек, которые зависят от физической природы сил взаимодействия мономерных звеньев и не обязательно усредняются по всему пространственному объему, занятому макромолекулой. Феноменологически можно считать, что температурные переходные кривые биополимеров соответствуют фазовым переходам первого рода, хотя в отличие от плавления обычных кристаллов здесь нет резкого разрыва термодинамических функций H и S из-за гетерогенности и малых размеров молекулы белка. Вместе с тем резкое изменение теплоемкости при переходе скорее напоминает переход второго рода.

В целом процесс образования глобулы в растворе полипептидных цепей и перехода ее затем в клубкообразное состояние при нагревании термодинамически неизбежен. Однако детали конструкции глобулы, ее структурные перестройки можно расшифровать лишь путем изучения конкретной природы объемных взаимодействий. Без решения этой проблемы невозможно понять, а тем более предсказать, свойства и особенности функционирования биополимеров в различных внешних условиях.

Глава VIII

Различные типы взаимодействий в макромолекулах



Первичная структура, или основная последовательность звеньев полимерной цепи (аминокислоты в цепи белка, нуклеотиды в цепи нуклеиновых кислот), определяется химическими или валентными взаимодействиями. Помимо этого, между молекулами действуют также слабые невалентные силы, которые приводят к притяжению на больших и к отталкиванию — на малых расстояниях. На рис. VIII.1 изображена типичная зависимость потенциальной энергии взаимодействия $U(r)$ двух частиц молекулярной природы от расстояния (r) между ними. Энергия взаимодействия $U(r)$, или потенциал взаимодействия, связана с силой взаимодействия $F(r)$:

$$F(r) = -dU(r)/dr. \quad (\text{VIII.1})$$

На малых расстояниях вследствие отталкивания молекул при взаимном проникновении их электронных оболочек преобладают силы отталкивания: $dU_{\text{отт}}(r)/dr < 0$, а на больших расстояниях преобладает притяжение: $dU_{\text{пр}}(r)/dr > 0$. Общий потенциал взаимодействия $U(r)$ представляет собой алгебраическую сумму:

$$U(r) = U_{\text{отт}}(r) - U_{\text{пр}}(r). \quad (\text{VIII.2})$$

Минимум на кривой $U(r)$ при $r=r_0$ (рис. VIII.1) соответствует равновесному положению, в котором силы притяжения уравновешиваются силами отталкивания.

Рис. VIII.1.
Типичный вид зависимости энергии взаимодействия от расстояния (объяснение см. в тексте)

Существуют различные типы взаимодействий, от которых в основном зависит вторичная структура макромолекул. Ниже будут кратко рассмотрены природа этих взаимодействий и их вклад в стабилизацию структуры биомолекул.

§ 1. Взаимодействия Ван-дер-Ваальса

Силы Ван-дер-Ваальса играют большую роль в образовании конденсированных жидких и твердых состояний, во взаимодействиях на поверхности раздела фаз. Ими определяются взаимодействия в газах и возникающие отклонения от законов идеальных газов. В первом приближении эти отклонения подчиняются известному уравнению Ван-дер-Ваальса для газов:

$$(p + a/v^2)(v - b) = nRT, \quad (\text{VIII.1.1})$$

где a , b — константы, определяющие взаимное притяжение и отталкивание молекул. В зависимости от соотношения между давлением (p) и объемом (v) могут осуществляться разные агрегатные состояния жидкости и газа и переходы между ними. В частности, для жидкости энергия межмолекулярных взаимодействий определяет теплоту испарения.

Биологические макромолекулы можно также рассматривать как своего рода конденсированную систему, состояние которой определяется слабыми невалентными взаимодействиями. Именно последние и дают основной вклад в стабилизацию конформационного состояния и его изменение в процессах функционирования.

Значение характерной энергии ван-дер-ваальсовых взаимодействий лежит обычно в диапазоне от 4—8 кДж/моль и выше, в то время как тепловая энергия молекулы при комнатной температуре ($T = 300$ К) составляет $RT \approx 48$ Дж/моль·град·300 град $\approx 2,52$ кДж/моль, а энергия ковалентных связей 170—630 кДж/моль. Силы Ван-дер-Ваальса имеют электромагнитную природу и определяются взаимодействием электрических диполей в соседних молекулах. В зависимости от того, обладают ли взаимодействующие молекулы постоянными электрическими дипольными моментами или последние возникают вследствие поляризуемости электронных оболочек, существуют различные типы сил Ван-дер-Ваальса.

Ориентационные взаимодействия

Рассмотрим взаимодействие двух диполей, ориентированных так, как это показано на рис. VIII.2. По закону Кулона, энергия ориентационного взаимодействия $U_{\text{оп}}$ дипольных моментов P_1 , P_2 равна

$$U_{\text{оп}}(R) = -\frac{e^2}{R - l_1} - \frac{e^2}{R + l_2} - \frac{e^2}{R + l_2 - l_1} + \frac{e^2}{R} \quad (\text{VIII.1.3})$$

и при $R \gg l_1, l_2$

$$U_{\text{оп}}(R) = -\frac{2e^2 l_1 l_2}{R^3} = -\frac{2P_1 P_2}{R^3}. \quad (\text{VIII.1.4})$$

Если диполи свободны и совершают тепловое движение, то в среднем они будут принимать ориентации, соответствующие притяжению, поскольку их собственная энергия E при этом понижается. Вероятность взаимного расположения

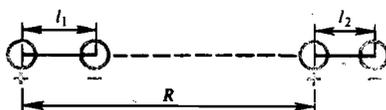
Рис. VIII.2.

Взаимодействие двух диполей, расположенных вдоль прямой ($|R| \gg l_1, l_2$)

Дипольные моменты P_1 и P_2 равны соответственно

$$P_1 = el_1, P_2 = el_2, \quad (\text{VIII.1.2})$$

где e — заряд электрона, l_1, l_2 — расстояние между противоположными зарядами. В системе СГСЭ $e = 4,8 \cdot 10^{-10}$ и при $l \approx 10^{-8}$ см (длина химической связи) $P \approx 10^{-18}$ в единицах СГСЭ или 1D (дебай)



диполей, следовательно, зависит от их энергии и определяется фактором Больцмана $\exp(-E/(k_B T))$. Усредняя величины $E \exp(-E/k_B T)$ по всем ориентациям, при $E \ll k_B T$ можно найти, что

$$U_{\text{ор}} = - \frac{2P_1^2 P_2^2}{3k_B T R^6}. \quad (\text{VIII.1.5})$$

Индукционные взаимодействия

Когда одна молекула имеет постоянный дипольный момент P_1 , она может навести диполь P_2 в другой молекуле, если последняя обладает определенной поляризуемостью α :

$$P_2 = \alpha E_1, \quad (\text{VIII.1.6})$$

где P_2 — наведенный диполь; α — коэффициент поляризуемости второй молекулы; E_1 — локальная напряженность электрического поля в центре поляризуемой молекулы, создаваемая постоянным диполем P_1 первой молекулы. Поле E_1 диполя P_1 на расстоянии R от постоянного диполя равно $E_1 = 2P_1/R^3$, если P_1 и R расположены параллельно. Отсюда можно показать, что энергия индукционного взаимодействия ($U_{\text{инд}}$), усредненная по всем ориентациям постоянного диполя P_1 , равна

$$U_{\text{инд}} = -\frac{1}{2} E_1^2 = -2\alpha P_1^2/R^6. \quad (\text{VIII.1.7})$$

Очевидно, смещение электронов в одну сторону при поляризации молекулы соседним постоянным диполем компенсируется их смещением в противоположную сторону за счет действия такого же постоянного диполя с обратным направленным моментом, который расположен по другую сторону молекулы. Поскольку в жидких и твердых телах поляризуемая молекула испытывает симметричное влияние большого количества соседних молекул, их результирующее действие в значительной степени компенсируется.

Дисперсионные взаимодействия

Наиболее распространенными видами невалентных взаимодействий являются дисперсионные, или поляризационные, взаимодействия, которые наблюдаются между молекулами, не обладающими постоянными дипольными моментами. Основная часть подобного взаимодействия обусловлена внешними наиболее слабо связанными электронами. Природа дисперсионных взаимодействий носит квантово-механический характер и является результатом появления «мгновенных» диполей, которые возникают при движении электронов в молекулах, не обладающих постоянными дипольными моментами.

В гармоническом приближении движение электрона в молекуле можно рассматривать в виде линейного гармонического осциллятора, энергия которого, как известно из квантовой механики, равна

$$E_n = (n + 1/2) \hbar \omega_0 \quad (n = 0, 1, 2, \dots), \quad (\text{VIII.1.8})$$

где ω_0 — частота колебаний такого электронного осциллятора, вычисляемая по правилам классической механики; n — квантовое число, значение которого определяет энергетический уровень электрона. Видно, что в низшем квантовом состоянии при $n=0$ энергия осциллятора не обращается в нуль и равна

$$E_0 = \hbar \omega_0 / 2. \quad (\text{VIII.1.9})$$

Значение $E_0 = 1/2 \hbar \omega_0$ называется нулевой энергией. Ее существование является следствием соотношения неопределенностей, согласно которому электрон как квантовая частица не может обладать одновременно определенной координатой (x) и импульсом (p). Импульс частицы (p) равен произведению ее массы (m) на скорость (v): $p = mv$, или $E = p^2 / (2m)$. Неопределенности в значениях координаты (Δx) и импульса (Δp) электронов связаны соотношением Гейзенберга

$$\Delta x \Delta p \approx \hbar, \quad (\text{VIII.1.10})$$

которое называется также соотношением неопределенностей. Вследствие (VIII.1.9) координата и импульс электрона не могут принимать одновременно строго определенных значений, т. е. $\Delta x \neq 0$, $\Delta p \neq 0$, а это возможно только в том случае, если электрон обладает какой-то минимальной энергией ($E_0 = \frac{1}{2} \hbar \omega_0$).

Иными словами, при $n=0$ существуют нулевые колебания электрона с энергией E_0 , которые связаны с быстрыми движениями и смещениями заряда из положений равновесия, а следовательно, с появлением «мгновенных» дипольных моментов в молекуле, находящейся в состоянии покоя. Появление дипольного момента в одной молекуле вызывает в окружающем пространстве поле и индуцирует дипольный момент в другой.

Взаимодействие этих быстро меняющихся дипольных моментов приводит к тому, что изменение дипольного момента одного осциллятора вызывает добавочную поляризацию в другом, и наоборот. Таким образом, эти два осциллятора оказываются взаимосвязанными. Строгий анализ показывает, что если раньше каждый из них колебался с частотой ω_0 , то теперь в системе связанных осцилляторов появляются две частоты ω_+ и ω_- , соответствующие симметричным и антисимметричным колебаниям (рис. VIII.3). Энергии связанных осцилляторов имеют дискретные квантовые значения

$$E_{n_+} = \hbar \omega_+ (n_+ + \frac{1}{2}); \quad E_{n_-} = \hbar \omega_- (n_- + \frac{1}{2}) \quad (\text{VIII.1.11})$$

или в нулевом состоянии $n_+ \approx n_- = 0$

$$E_{n_+} = \hbar \omega_+ / 2, \quad E_{n_-} = \hbar \omega_- / 2, \quad (\text{VIII.1.12})$$

где

$$\omega_+ = \omega_0 \left(1 - \frac{e^2}{R^3 f} - \frac{e^4}{2R^6 f^2} \right);$$

$$\omega_- = \omega_0 \left(1 + \frac{e^2}{R^3 f} - \frac{e^4}{2R^6 f^2} \right); \quad f = m \omega_0^2.$$

Полная энергия системы связанных осцилляторов будет

$$E = E_{n_+} + E_{n_-} = \hbar \omega_0 \left(1 - \frac{e^4}{2R^6 f^2} \right). \quad (\text{VIII.1.13})$$

При сравнении этого выражения с суммой нулевых энергий несвязанных осцилляторов (VIII.1.9)

$$E = \hbar \omega_0 / 2 + \hbar \omega_0 / 2 = \hbar \omega_0$$

видно, что полная энергия системы меньше этой суммы на величину $e^4 \hbar \omega_0 / (2R^6 f^2)$, которая и есть энергия связи, или энергия дисперсионного взаимодействия ($U_{\text{дисп}}$):

$$U_{\text{дисп}} = - \frac{e^4 \hbar \omega_0}{2f^2 R^6}. \quad (\text{VIII.1.14})$$

Таким образом, изменение уровней энергии, связанное с появлением мгновенной асимметрии в распределении зарядов, является физической причиной

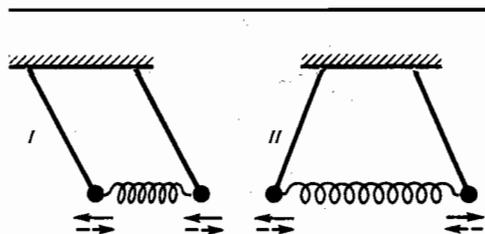


Рис. VIII.3. Симметричные (I) и несимметричные (II) колебания связанных маятников (по Э. В. Шпольскому, 1974)

сил межмолекулярных взаимодействий между молекулами, находящимися в основном состоянии. Более строгий расчет дисперсионного взаимодействия дает выражение

$$U_{\text{дисп}} = - \frac{3I_1 I_2}{2(I_1 + I_2)} \frac{\alpha_1 \alpha_2}{R^6}$$

где I_1, I_2 — ионизационные потенциалы; α_1, α_2 — поляризуемости молекул.

Относительная роль разных видов сил Ван-дер-Ваальса для отдельных веществ приведена в табл. VIII.1.

Таблица VIII.1. Значения поляризуемости, дипольного момента, потенциала ионизации и энергии различных видов слабых взаимодействий между некоторыми атомами и молекулами

Вещество	$\alpha, \text{см}^3 \cdot 10^{24}$	$P, \text{э. е.} \times 10^{18}$	$I, \text{эВ}$	$(\times 10^5 \text{ Дж})$		
				$U_{\text{ор}}$	$U_{\text{инд}}$	$U_{\text{дис}}$
H	0,667	0	13,6	0	0	6,1
O ₂	1,57	0	13,6	0	0	39,8
N ₂	1,74	0	15,8	0	0	57,2
H ₂ O	1,48	1,84	18,0	190	10	47
NH ₃	2,24	1,5	11,7	84	10	70

Суммарное ван-дер-ваальсово взаимодействие двух молекул определяется суммой выражений (VIII.1.5), (VIII.1.7) и (VIII.1.6) и составляет от 4,0 до нескольких десятков кДж/моль. Для многих биологически важных макромолекул глубина ван-дер-ваальсового энергетического минимума лежит в диапазоне 4—13 Дж/моль в пересчете на число взаимодействующих пар групп, что по порядку сравнимо с величиной тепловой энергии молекул при комнатной температуре (2,5 кДж/моль). Существенным отличием дисперсионных сил от ориентационных и индукционных является их аддитивность. Это связано с тем, что при одновременном взаимодействии нескольких молекул каждая из них наводит во всех остальных молекулах координированные мгновенные диполи, находящиеся в фазе с соответствующими возбуждающими диполями. Каждый из этих наведенных диполей ориентирован всегда так, что он притягивается к соответствующему индуцирующему. В то же время другие диполи, не находящиеся в фазе с этим последним, только периодически взаимодействуют с ним и после усреднения по всем возможным фазам дают нулевой вклад в энергию.

На малых расстояниях начинают сказываться силы отталкивания между атомами, которые связаны с эффектами отталкивания электронных облаков при их взаимопроникновении. Более подробно физическая природа сил отталкивания раскрывается в квантовой механике и связана с обменными взаимодействиями с учетом принципа Паули.

В последующих главах эти вопросы будут обсуждаться в связи с проблемой миграции энергии в биоструктурах. Сейчас необходимо отметить, что обменные взаимодействия происходят при перекрывании волновых функций электронов, т. е. на расстояниях $\sim 0,1$ нм (т. е. длин химических связей), и убывают с расстоянием скорее ($\sim 1/R^2$), чем притяжение ($\sim 1/R^6$) диполей, индуцированных посредством действия электромагнитных полей.

Потенциалы взаимодействия. Как видно из рис. VIII.1, эти потенциалы складываются из энергии притяжения ($-A/R^6$) и отталкивания; их, как правило, не рассчитывают строго теоретически, а задают в виде атом-атомных потенциалов Букингема

$$U(R_{ik}) = -A/R_{ik}^6 + B \exp(-\mu R_{ik}) \quad (\text{VIII.1.15})$$

или Леннарда — Джонса

$$U(R_{ik}) = -A/R_{ik}^6 + B/R_{ik}^{12}, \quad (\text{VIII.1.16})$$

где A , B , μ — константы; R_{ik} — расстояние между взаимодействующими атомами (i и k). Первые члены (VIII.1.15) и (VIII.1.16) соответствуют притяжению, вторые — отталкиванию. Например, значения эмпирических параметров A и B потенциала Леннарда—Джонса для $O \cdots O$ -взаимодействий составляют $A = 1547,7$ кДж·нм⁵/моль, $B = 895,23 \cdot 10^3$ кДж·нм¹¹/моль, а для $H \cdots C$ -взаимодействий они снижаются до значений 536,7 и $238,1 \cdot 10^3$ соответственно. Формулы (VIII.1.15) и (VIII.1.16) при заданных значениях констант определяют минимальное расстояние R_0 , на котором система из двух взаимодействующих атомов устойчива. Если ограничиться только силами Ван-дер-Ваальса, не принимая во внимание других взаимодействий, то силовое поле вокруг атома обладает центром симметрии. Тогда можно определить тот эффективный объем вокруг атома, или эффективный радиус взаимодействия, в пределах которого невозможно одновременное нахождение двух атомов.

Г. Рамачандран (1963) нашел минимальные расстояния для пар различных атомов и небольших атомных групп (CH_3 , CH_2). Например, для пары ковалентно не связанных атомов $C \cdots C$ обычное расстояние составляет 0,32 нм, а минимально возможное — 0,3 нм; для $C \cdots O$ это соответственно 0,28 и 0,27, а для $C \cdots N$ — 0,29, для $H \cdots H$ — 0,2 и 0,19 нм.

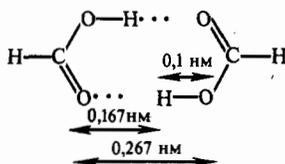
Использование этих расстояний полезно при составлении стерических карт биополимеров, так как позволяет определить стерически разрешенные области взаимного расположения атомных групп. Однако недостатком данного подхода явилось предположение о центрально-симметричной картине взаимодействия и пренебрежение направленным характером сил, что, как будет показано дальше, существенно в случае других видов взаимодействий. Силы Ван-дер-Ваальса лежат в основе формирования ряда биоструктур и, в частности, биспиральных полинуклеотидов. Упаковка плоских молекул азотистых оснований в вертикальные пачки обеспечивается «вертикальными» (стэкинг) взаимодействиями, в которые дисперсионный член $U_{\text{дисп}}$ (VIII.1.14) вносит существенный вклад. Так, для стэкинг-взаимодействий пар цитозин—гуанин $U_{\text{дисп}} = -39,1$ кДж/моль, а значение $U_{\text{отт}} = +18,14$ кДж/моль. С учетом водородных связей и электростатического отталкивания суммарное значение энергии взаимодействий в этом случае составляет $-27,9$ кДж/моль. «Горизонтальные» взаимодействия ответственны за упаковку азотистых оснований в одной плоскости и определяют образование комплементарных пар аденин—тимин ($A—T$) и гуанин—цитозин ($G—C$). В этом случае дисперсионные взаимодействия играют меньшую роль, а основной вклад вносит электростатическое притяжение. Так, для пары $A—T$ $U_{\text{дисп}} = -7,18$ кДж/моль, $U_{\text{эл-стат}} = 19,32$ кДж/моль, $U_{\text{отт}} = +16,0$ кДж/моль, $U_{\text{вода}} = -2,48$ кДж/моль, что в сумме дает $\Sigma U = 12,01$ кДж/моль. В гл. XV рассматриваются взаимодействия Ван-дер-Ваальса между двумя плоскостями.

§ 2. Водородная связь. Заряд-дипольные взаимодействия

Наряду с обычными силами Ван-дер-Ваальса большую роль в стабилизации биоструктур играют также водородные связи и электростатические взаимодействия между заряженными и полярными группами. В частности, известно, что водородные связи стабилизируют вторичную структуру полипептидных цепей.

Водородная связь. Эта связь осуществляется между атомом водорода, химически связанным с одной молекулой и электроотрицательными атомами O ,

N, F, Cl, принадлежащими, как правило, другой молекуле (существуют случаи внутримолекулярной водородной связи). Природа водородной связи сложна и не сводится только к электростатическому притяжению, хотя оно и дает основной вклад в энергию водородной связи. По данным структурного анализа кристаллов, расстояние между электроотрицательными атомами, связанными водородной связью, обычно меньше ван-дер-ваальсовых радиусов соответствующих атомов примерно на 0,02—0,05 нм. Например, сумма ван-дер-ваальсовых радиусов для пары атомов O...O составляет 0,28 нм, а при образовании водородной связи O—H...O это расстояние сокращается до 0,27—0,25 нм. Так, в димере муравьиной кислоты



где расстояние O—H в гидроксиле равно 0,1 нм, длина водородной связи, как видно, составляет 0,167 нм. Теплота димеризации муравьиной кислоты 59,22 кДж/моль; следовательно, на энергию одной H-связи приходится 29,61 кДж/моль.

Наряду с электростатическим взаимодействием, ван-дер-ваальсовым притяжением и отталкиванием (см. VIII.1.15), (VIII.1.16)) в энергию водородной связи $U_{\text{водор}}$ вносит вклад и энергия делокализации $U_{\text{делок}}$ двух электронов связи

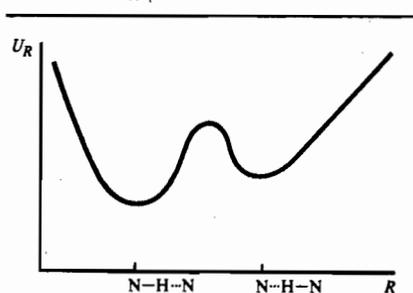


Рис. VIII.4.

Потенциальная функция водородной связи с двумя минимумами (схема, отвечающая локализации H около двух разных атомов азота) (по Я. Ладику, 1975)

(A—H) и неподеленной пары электронов другого электроотрицательного атома (B), что также уменьшает ее длину. Например, для связи O—H...O $U_{\text{водор}} = U_{\text{эл-стат}} + U_{\text{дисп}} + U_{\text{делок}} + U_{\text{отт}}$, что дает соответственно $U_{\text{водор}} = |-25,2 - 12,6 - 33,6 + 35,28| = |-36,12|$ кДж/моль.

Как правило, значения энергии H-связи лежат в пределах 12,6—33,6 кДж/моль. Протон может двигаться между электроотрицательными атомами водородной связи вдоль прямой, соединяющей их. Однако в различных точках протон испытывает влияние различных по напряженности электрических полей, образованных ядрами атомов молекулы и распределенными электронами. Экспериментальные и квантово-механические

исследования показали, что потенциальная функция водородной связи имеет вид асимметричной кривой связи вдоль прямой, соединяющей их. Однако в различных точках протон испытывает влияние различных по напряженности электрических полей, образованных ядрами атомов молекулы и распределенными электронами. Экспериментальные и квантово-механические исследования показали, что потенциальная функция водородной связи имеет вид асимметричной кривой с двумя минимумами (рис. VIII.4), локализованными вблизи электроотрицательных атомов, между которыми протон совершает туннельные переходы (о туннельном механизме см. § 3 гл. XIII). Проявляется водородная связь в спектрах, приводя, в частности, к уширению и увеличению интенсивности

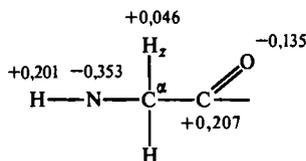
инфракрасных полос поглощения O—H-групп. Частоты колебаний групп, содержащих водород, снижаются при образовании с ним водородных связей.

Электростатические взаимодействия. Этот вид взаимодействий не только дает вклад в энергию водородных связей, но и играет важную самостоятельную роль в стабилизации биоструктур. Различные атомы в пептидных цепочках сильно различаются по характеру распределения на них зарядов. Взаимодействие частично заряженных атомов характеризуется электростатическим потенциалом, вид которого задается уравнением

$$U_{\text{эл.-стат}} = \sum \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}}, \quad (\text{VIII.2.1})$$

где q_i, q_j — величины парциальных зарядов на атомах (i, j); R_{ij} — расстояние между атомами; ϵ — диэлектрическая постоянная, зависящая от поляризуемости атомов и их взаимного расположения, значение которой для белков обычно принимается равным $\sim 3,5$. Величины парциальных зарядов определяются как сумма σ и π атомных зарядов. При расчете методом Дель Ре σ -заряд на i -м атоме складывается из частичных зарядов q_i^j , индуцированных всеми атомами j , которые отделены от i только одной связью. Определение π -зарядов проводят методами квантовой химии (метод Хюккеля) для π - (делокализованных) электронов. Критерием правильности значений параметров в таких расчетах служит совпадение рассчитанных зарядов распределений и порядков связей в молекулах с экспериментальными значениями дипольных моментов и длин связей. Например, характер распределения парциальных зарядов на атомах глицина:

Атом	Заряд
H	+0,201
N	-0,353
C	+0,207
O	-0,135
H ₂	+0,046



Учет электростатических взаимодействий наряду с собственно ван-дер-ваальсовыми силами несколько изменяет, хотя и незначительно, расстояния между атомами и, следовательно, их общее стерическое расположение в структуре биополимеров. Представления о точечной локализации зарядов на атомных центрах не позволяют учитывать закономерности, связанные с объемным и направленным распределением зарядовой плотности. Сравнение зависимости энергии от расстояния, вычисленной между двумя точечными зарядами и двумя $1s$ -электронными облаками атома водорода, показывает совпадение обоих результатов на расстояниях $R \geq 0,175 \div 0,2$ нм; иными словами, для атома водорода точечное приближение оправдано на расстояниях, составляющих 60—70% от суммы ван-дер-ваальсовых радиусов.

§ 3. Внутреннее вращение и поворотная изомерия

Рассмотрим зависимость конформации линейной полимерной цепи от характера взаимодействий атомных групп, природа которых обсуждалась в предыдущем разделе.

Энергия внутреннего вращения. В нормальных условиях длины связей и валентные углы (между прилегающими связями) остаются практически пос-

тоянными, поскольку они испытывают при обычных температурах лишь незначительные тепловые флуктуации (не превышают 3% от длины связей ($\pm 0,005$ нм) и $\pm(3 \div 5)^\circ$ для валентных углов). Остающиеся переменные, которые определяют конформацию полимерной молекулы, представляют собой углы поворота вокруг связей или углы внутреннего вращения φ_i . Это двугранные углы между двумя плоскостями, образованными парами связей $i-1, i$ и $i, i+1$.

На рис. VIII.5 показана в качестве примера полиметиленовая цепь в трансконформации, где все углы φ_i внутреннего вращения атомов водорода

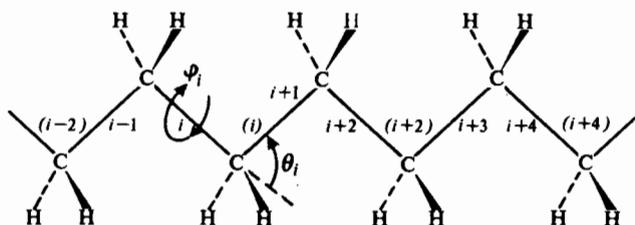


Рис. VIII.5.

Участок полиметиленовой цепи (по П. Флори, 1971):

 θ — валентный угол, φ_i — угол внутреннего вращения

CН-групп вокруг единичной i -связи равны нулю. На рис. VIII.5 знак φ_i взят положительным для правого вращения и измеряется относительно трансформы. Так как все длины связей и валентные углы θ_i остаются постоянными, то конфигурация главной цепи определяется набором $n-2$ величин $\varphi_2, \varphi_3, \dots, \varphi_{n-1}$ или $\{\varphi\}$. Таким образом, разные конформации получаются вследствие вращения атомных групп вокруг отдельных единичных связей. Принципиальным обстоятельством является то, что внутренние вращения связей не являются независимыми. Следовательно, энергию полимера нельзя представить в виде простой суммы энергий мономерных звеньев

$$E\{\varphi\} = \sum_{i=2}^{n-1} E_i(\varphi_i), \quad (\text{VIII.3.1})$$

поскольку взаимное влияние поворотов звеньев проявляется в зависимости E_i не только от φ_i , но и от φ_{i-1} и φ_{i+1} . Влиянием более удаленных связей можно, вообще говоря, пренебречь. Отсюда следует, что энергия конформации $E\{\varphi\}$ зависит от энергии взаимодействия соседних звеньев или от соседних углов вращения:

$$E\{\varphi\} = \sum_{i=2}^{n-1} E_i(\varphi_{i-1}, \varphi_i), \quad (\text{VIII.3.2})$$

где каждый из членов суммы E_i рассматривается как вклад в общую конформационную энергию $E\{\varphi\}$, обусловленный состоянием связей i и $i-1$. Взаимодействие связей i и $i+1$ описывается следующим членом суммы $E_{i+1}(\varphi_i, \varphi_{i+1})$, зависящим от соответствующей пары последовательных углов внутреннего вращения.

Подобная статистическая система, где энергия составляющих элементов зависит от взаимодействия их друг с другом, называется кооперативной. Линейная полимерная система одьмерна и, следовательно, представляет собой одно-

мерную кооперативную систему с координационным числом, равным 2 (по числу соседних звеньев у каждого звена)

Потенциал внутреннего вращения. Как было показано, энергия ближних взаимодействий атомных групп, проявляющаяся при вращении их вокруг единичных связей, определяет общую конформационную энергию полимерной цепи. Природа этих взаимодействий связана в основном с отталкиванием атомов, у которых перекрываются электронные оболочки, вследствие чего появляется тормозящий энергетический потенциал внутреннего вращения, препятствующий

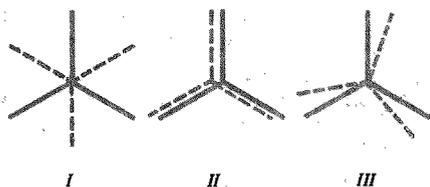


Рис. VIII.6.

Расположение СН-связей этана в транс (I), цис (II) и промежуточной (III) конформациях (проекция на плоскость, перпендикулярную С—С-связям)

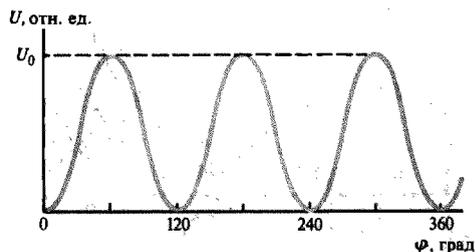


Рис. VIII.7.

Зависимость потенциальной энергии внутреннего вращения в этане от угла поворота

Значения углов 0, 120° и т. д. соответствуют случаю I рис. VIII.6, углов 60, 180° и т. д. — случаю II рис. VIII.6

вращению атомных групп. В зависимости от расстояния между вращающимися атомными группами при изменении угла поворота вокруг единичной связи значение тормозящего потенциала будет различно и, следовательно, различные поворотные изомеры дают различный вклад в конформационную энергию всей молекулы.

Барьер в основном возникает в результате стерического отталкивания близко расположенных валентно не связанных атомов, причем определенную роль играют поляризационные эффекты, зависящие от вращения. Кроме того, у единичной связи (sp^3) имеется и собственный тормозящий потенциал, обусловленный взаимодействиями орбиталей и заместителей одного из атомов с орбиталями и заместителями другого. Это так называемый квантово-механический эффект ориентации связей, примыкающих к оси вращения (Л. Полинг, 1959).

Как видно из рис. VIII.6 и VIII.7, молекула этана имеет минимум конформационной энергии в трансконформации и максимум — в цисконформации. Энергетический барьер при переходе одной трансконформации в другую через цисформу при повороте вокруг С—С-связи на угол $\varphi = 120^\circ$ равен $\sim 12,5$ кДж/моль. На основе только ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий эта величина должна составлять лишь $\sim 2,1$ кДж/моль. Минимум энергии осуществляется, если заместители соответствующих групп находятся в скрещенных конформациях, а максимумы соответствуют затемненным конформациям. Зависимость потенциала внутреннего вращения от угла поворота в этом случае можно аппроксимировать выражением

$$E(\varphi) = (E_0/2)(1 - \cos 3\varphi), \quad (\text{VIII.3.3})$$

где E_0 — высота барьера.

На рис. VIII.8 представлена кривая зависимости конформационной энергии от угла поворота вокруг С—С-связи в n -бутане.

Как видно, кривая $E(\varphi)$ в этом случае несимметрична: один, наиболее глубокий, минимум ($0^\circ, 360^\circ$) отвечает трансконформации, два других — конформациям, получаемым поворотом из трансположения одной CH_3 -группы относительно другой на $+120^\circ$ и -120° . Эти конформации называются «свертками» или гошконформациями (g^+, g^-). Совершенно иная ситуация происходит в случае цепи сопряженных связей, вращение вокруг которых затруднено (см. гл. IX).

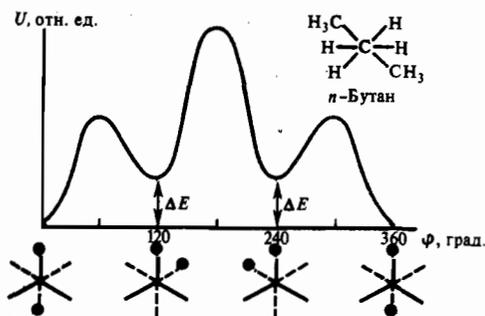


Рис. VIII.8.

Зависимость потенциальной энергии внутреннего вращения в *n*-бутане от угла поворота (объяснение в тексте)

Поворотная изомерия. Различающиеся между собой устойчивые конформации, возникающие в результате поворотов вокруг единичных связей, называются поворотными изомерами. При значениях высоты барьеров около 12,5 кДж/моль частота перескоков между поворотными изомерами при комнатной температуре составляет 10^{10} с^{-1} , так что разделить поворотные изомеры в этом случае невозможно. Поэтому целый ряд равновесных характеристик молекул (дипольный момент, сила вращения и пр.) есть результат усреднения по всем поворотным изомерам. Однако спектральные линии для них несколько различаются, так как проявляются за времена, меньшие

времени жизни поворотного изомера. Впервые это было обнаружено Ф. Коляраушем (1932) с помощью спектров комбинационного светорассеяния.

В настоящее время поворотные изомеры могут быть также обнаружены с помощью ЯМР-, ИКС-, радиочастотной спектроскопии. Заселенность отдельных минимумов определяется разностью внутренних энергий поворотных изомеров ΔE и температурой. Оценка изменения интенсивностей спектральных линий с температурой, связанного со сдвигом равновесного распределения по энергиям поворотных изомеров, дает возможность найти разность энергий между поворотными изомерами ΔE . При $T \rightarrow \infty$ $N_T = N_{g^+} = N_{g^-} = 1/3 N$, где N — полное число молекул (для поворотных изомеров *n*-бутана). При понижении температуры спектр сильно обедняется за счет вымораживания менее устойчивых поворотных изомеров или ротамеров.

В 1951 г. М. В. Волькенштейн выдвинул теорию поворотной-изомерной строения биополимеров. Он предложил заменить непрерывную функцию $E(\varphi)$ разрывной в соответствии с набором дискретных поворотных состояний. Такое поворотной-изомерное приближение, согласно которому непрерывное распределение по φ заменяется распределением по нескольким дискретным состояниям, оправдано, когда минимумы энергии разделены барьерами, величина которых существенно превышает $k_B T$.

На основе поворотной-изомерной теории, зная энергии различных поворотных изомеров, можно вычислить вероятность определенной конформации молекулы. Вращательная статистическая сумма *i*-й связи, определяемая интегралом

$$Z_i = \int_0^{2\pi} \exp \left[-\frac{E_i(\varphi)}{RT} \right] d\varphi, \quad (\text{VIII.3.4})$$

в поворотной-изомерном приближении заменяется на сумму из ν членов, где ν — число поворотных изомеров данной *i*-связи;

$$E_{ii}=0; E_{g+i}=0; E_{g-i}=0;$$

$$E_{ig}=E_{g\pm g\pm}=E_g \approx 2,1 \text{ кДж/моль};$$

$$E_{g\pm g\mp} \approx 12,5 \text{ кДж/моль}.$$

Отсчет ведется от плоской трансконформации. К энергии E_i относятся все вклады, обусловленные переходом связи i из транссостояния t в гаусс-состояния g^+ или g^- при изменении угла φ_i до соответствующих его значений.

Статистические веса полученных повторных изомеров образуют матрицу

$$\hat{g} = \begin{pmatrix} (t) \\ (g^+) \\ (g^-) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} (t) & (g^+) & (g^-) \\ 1 & g & g \\ 1 & g & 0 \\ 1 & 0 & g \end{pmatrix}. \quad (\text{VIII.3.12})$$

Энергия каждого состояния в (VIII.3.12) определяется по отношению к трансконформации по формуле, аналогичной (VIII.3.6):

$$g = \exp [-E_g / (k_B T)],$$

где E_g —энергия g^\pm -состояния относительно t -состояния. В (VIII.3.12) значение $(-E_{g+g^-} / (k_B T))$ принимается равным нулю, а $\exp (-E_{g+g^+} / (k_B T)) \approx 1$. Состояния предыдущей связи приведены слева от строки, а состояния самой связи обозначены над столбцами. Элементы первого столбца, соответствующие отсчету энергии от трансположения связи i , равны единице.

Вычисления показывают, что в полиметилеене доли (ρ_i) связей, находящихся в состояниях t , g^+ , g^- , равны соответственно

$$\rho_t = 1/2, \rho_{g^+} = \rho_{g^-} = 1/4.$$

Подобные расчеты основаны на вычислении общей энергии конформации молекулы и соответствующего статистического веса этой конформации, причем поворотнo-изомерное приближение учитывает кооперативные свойства линейного полимера в виде попарных взаимодействий соседних звеньев. Часто бывает удобным представлять полимерную цепь в виде, показанном на рис. VII. 4. Здесь цепь является последовательностью прямолинейных сегментов с фиксированным валентным углом Θ и потенциалом внутреннего вращения $U(\varphi)$. Эта модель пригодна для описания цепей с симметричными привесками (например, полиэтилен $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$). Можно провести строгий расчет среднего размера клубка \bar{L}^2 для этой модели. В результате вместо (VII.1.7) получается так называемая формула Ока:

$$\bar{L}^2 = Nl^2 \frac{1 - \cos \Theta}{1 - \cos \Theta} \frac{1 + \eta}{1 - \eta}, \quad (\text{VIII.3.13})$$

где η —средний косинус угла внутреннего вращения:

$$\eta = \overline{\cos \varphi} = \int_0^{2\pi} \exp \left(-\frac{E(\varphi)}{k_B T} \right) \frac{\cos \varphi d\varphi}{\int_0^{2\pi} e^{-E(\varphi)/(k_B T)} d\varphi}. \quad (\text{VIII.3.14})$$

Таким образом, для вычисления η по формуле (VIII.3.14) необходимо знание формы потенциальной энергии $E(\varphi)$.

В поворотнo-изомерном приближении при усреднении $\cos \varphi = \eta$ интегрирование заменяется на суммирование по всем поворотным изомерам с учетом их статистических весов, т. е.

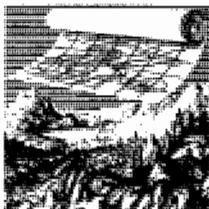
$$\eta = \bar{\cos \varphi} = \frac{\sum_i \cos \varphi_i e^{-E_i/(k_B T)}}{\sum_i e^{-U_i/(k_B T)}} = \frac{\sum_i \cos \varphi_i e^{-E_i/(k_B T)}}{\sum_i e^{-\Delta U_i/(k_B T)}}, \quad (\text{VIII.3.15})$$

где φ_i —углы, соответствующие поворотным изомерам; E_i —энергии поворотных изомеров; $g_i = e^{-E_i/(k_B T)}$ —их статистические веса и, наконец, $\Delta E_i = E_i - E_1$.

Интересно, что если ось вращения является осью симметрии второго и более высокого порядка, то из (VIII.3.15) следует, что $\cos \varphi$, $\sin \varphi$ и т. д. равны нулю. Следовательно, все равновесные свойства молекулы такие же, как и при свободном вращении. Поворотной-изомерная теория позволяет понять физические механизмы растяжения полимеров, когда изменяется перераспределение ротамеров и их взаимодействие в цепи, а также показывает, что гибкость цепи определяется «перескоками» между энергетическими ямами отдельных поворотных изомеров.

Глава IX

Конформационная энергия и пространственная организация биополимеров



В этой главе рассматривается пространственная структура биополимеров, приведены расчеты конформационных энергий и принципы построения энергетических карт простых полипептидов.

§ 1. Конформационная энергия полипептидной цепи

Полипептиды составляют структурную основу белков и обладают уникальным сочетанием структурно-молекулярных особенностей.

Природа пептидной связи. Общий характер строения полипептидной цепи, состоящей из последовательно соединенных аминокислотных остатков, представлен на рис. IX.1. В основе ее лежит пептидная связь, образованная

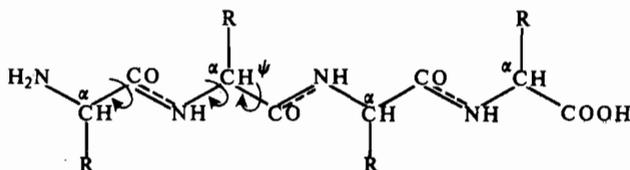
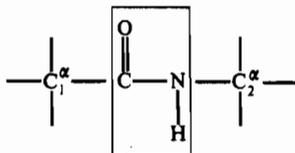


Рис. IX. 1.
Фрагмент полипептидной цепи

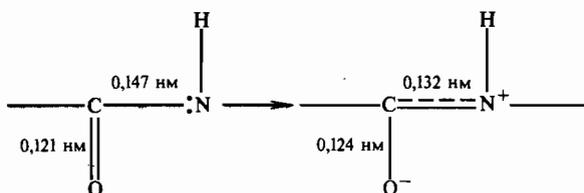
—COOH-группой одной и —NH₂-группой другой аминокислоты —CO—NH—.



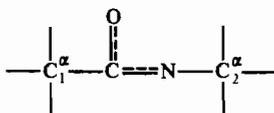
где C₁^α, C₂^α — α-углеродные атомы, принадлежащие этим аминокислотам.

Важнейшей особенностью пептидной связи является ее частично двойной характер. Рентгенографические исследования простых пептидов показали, что длина пептидной связи N—C существенно меньше величины 0,147 нм, характерной для одиночной связи, и составляет 0,132 нм, что несколько превышает значение 0,125 нм, характерное для длины обычной двойной связи C=N. Причина этого состоит в том, что неподеленная пара 2s² электронов атома азота обобществляется между углеродами и азотом, давая примесь

двойной связи между ними. При этом электрон углерода «выталкивается» из двойной π -связи $C=O$ и локализуется на атоме кислорода, частично превращая связь $C=O$ в одиночную и увеличивая ее длину от 0,121 до 0,124 нм:



Таким образом, между атомами N, C, O происходит делокализация электронов, сопровождающаяся сдвигом электронной плотности в направлениях $N \rightarrow C \rightarrow O$:



Поскольку все три атома N, C, O участвуют в формировании двойной связи, их s - и p -орбитали гибридизуются с образованием sp -гибридных орбиталей. Одиночные σ -связи возникают между атомами за счет орбиталей

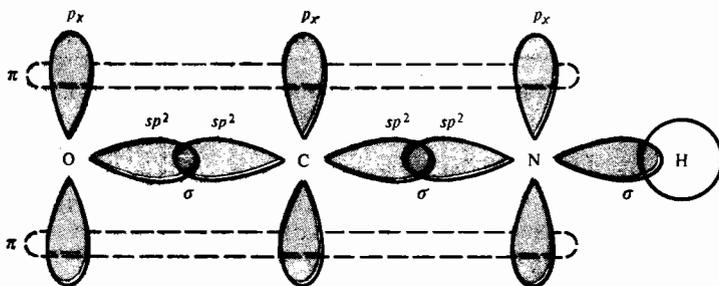


Рис. IX.2.
Электронная конфигурация полипептидной цепи

$O(sp^2)$ и $C(sp^2)$, а также $C(sp^2)$ и $N(sp^2)$. Три p_x -орбитали атомов N, C, O, перпендикулярные плоскости σ -связей, перекрываются и образуют делокализованную систему π -электронов (рис. IX.2). Энергия делокализации электронов, стабилизирующих структуру пептидной группы, зависит от степени перекрытия электронных орбиталей. Стабилизация оказывается максимальной, когда атомы пептидной группы, включая α -углеродные атомы соседних аминокислот, расположены в одной плоскости. В соответствии с изомерной теорией пространственное строение полипептидной цепи определяется вращением вокруг единичных связей между соседними атомами (см. рис. IX.1). В силу двойного характера пептидной связи $C=N$ вращение вокруг нее (угол ω) затруднено и поэтому необходимо учитывать только вращение вокруг связей $N-C^\alpha$ (угол φ) и $C^\alpha-C$ (угол ψ) (рис. IX. 3).

Энергия внутреннего вращения полипептидной цепи. Значения барьеров внутреннего вращения E_0 для углов φ и ψ принимаются равными 0,84—2,52 кДж/моль, что намного меньше значения $E_0 \sim 84$ кДж/моль для пептидной связи $C-N$. Пептидная группа $CO-NH$ вращается вокруг этих связей как единое целое, без нарушения расположения атомов в единой плоскости

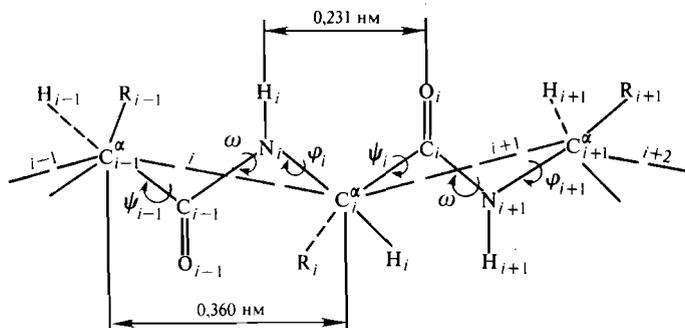


Рис. IX.3.
Пространственная конфигурация полипептидной цепи

(рис. IX. 4). Изменение одного из углов пары φ_i, ψ_i приводит соответственно к такому изменению стерических взаимодействий, которое зависит от значения другого угла. Иными словами, имеет место попарное кооперативное взаимодействие при вращении вокруг единичных связей, принадлежащих одному и тому же α -углеродному атому. Однако взаимосвязанные вращения

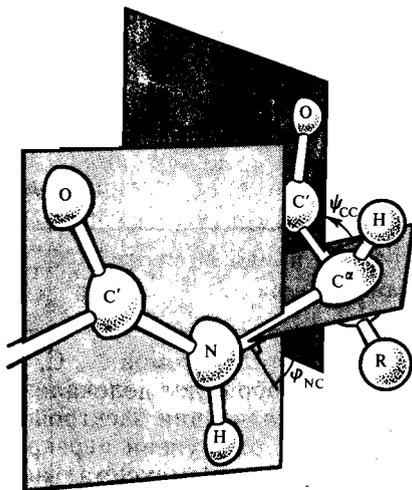


Рис. IX.4.
Две пептидные группировки, связанные с помощью углеродных атомов (по А. G. Walton, J. Blackwell, 1973)

Два угла φ и ψ определяют вращение вокруг единичной связи $N-C^\alpha$ и $C^\alpha-C'$ соответственно; φ и $\psi = 0$, когда две плоскости, определяющие угол, совпадают; значение φ увеличивается, ψ — уменьшается, когда плоскости вращаются, как обозначено стрелками. Рисунок представляет сегмент правовращающей L-аминокислоты

в пределах одной пары углов (φ_i, ψ_i) совершенно не зависят от значений соседней пары углов ($\varphi_{i-1}, \psi_{i+1}$) или ($\varphi_{i+1}, \psi_{i+1}$).

Таким образом, полипептидная цепь является цепью с «изолированными» парами углов внутреннего вращения, где каждая пара углов может рассматриваться независимо. Причина этого состоит в том, что при изменении пар

ϕ_i , ψ_i и ϕ_{i+1} , ψ_{i+1} или ϕ_i , ψ_i и ϕ_{i-1} , ψ_{i-1} отсутствуют стерические перекрытия атомов i -й пептидной единицы с $(i+2)$ -й или $(i-2)$ -й единицами. Данное важное свойство позволяет свести взаимодействия ближнего порядка к взаимодействиям соседних пептидных единиц. Принимая это во внимание и исходя из взаимодействий Ван-дер-Ваальса, Г. Рамачандран построил стерические диаграммы, позволяющие определять допустимые значения углов ϕ и ψ , при которых данный остаток не испытывает сильных стерических перекрытий с другими атомными группами. На рис. IX.5 представлена стерическая диаграмма для поли-L-аланина. В областях, ограниченных сплошными линиями, расстояния между парами валентно не связанных атомов соответствуют верхнему пределу значений расстояний между атомами или превышают его. Для областей, ограниченных пунктирными линиями, эти расстояния меньше и соответствуют нижним предельно допустимым значениям (см. § 1 гл. VIII). На рис. IX.5 имеются две полностью разрешенные области I и II, ограниченные сплошными линиями; область I включает параллельную и антипараллельную складчатые β -структуры поли-L-аланина. Области II принадлежит левая α -спиральная структура. Допустимая область составляет лишь часть от всего интервала углов, который включает также левую α -спираль (область III).

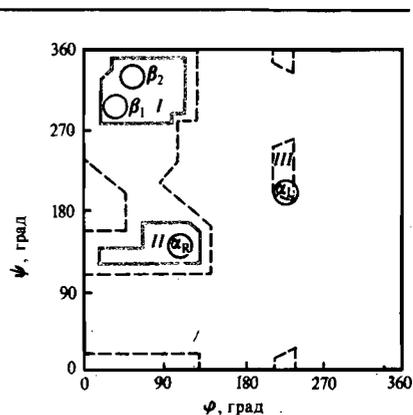


Рис. IX.5.

Сферическая стерическая карта поли-L-аланина (по А. G. Walton, J. Blackwell, 1973)

Пунктиром обведены контактные положения, в которых цветной линией показаны области равновесных положений (остальные объяснения см. в тексте)

Границы полностью разрешенных областей могут несколько расширяться на $5-10^\circ$ при изменении валентных углов вследствие их небольшой тепловой деформации.

Особенности структуры белка. Прежде чем перейти к расчетам конформационной энергии полипептидов, необходимо кратко вспомнить основные черты пространственной структуры белковых молекул, установленные в настоящее время. Важную роль в формировании конформации полипептидов играют ван-дер-ваальсовы взаимодействия, водородные связи, электростатические эффекты и гидрофобные взаимодействия, причем решающее значение имеют первые два фактора. Природа гидрофобных взаимодействий будет рассмотрена ниже в связи с проблемой состояния воды в биоструктурах.

В классических работах Л. Полинга и Р. Б. Кори были сформулированы принципы образования структуры регулярной полипептидной цепи. 1. Длины связей и валентные углы всех пептидных групп одинаковы. 2. Полипептидная цепь должна быть максимально насыщена водородными связями. 3. Конформационные состояния всех звеньев полипептидной цепи являются эквивалентными.

Построенная на основе этих предположений α -спиральная форма характеризуется следующими основными параметрами: высота витка $L=0,54$ нм, число остатков в одном витке 3,6, проекция остатка на ось 0,15 нм. Отдельные витки спирали связаны внутримолекулярными водородными связями вдоль оси спирали.

β -Конформация представляет собой складчатую структуру, включающую

параллельные цепи, связанные между собой поперечными межцепочечными водородными связями. Основная роль в стабилизации α - и β -структур принадлежит водородным связям, хотя определенные значения имеют взаимодействия боковых цепей и взаимодействия участков основных цепей с растворителем (рис. IX.6 и IX.7).

Согласно классификации белковых структур, насыщенные водородными связями регулярные участки α -спирали и β -структуры принадлежат ко вто-

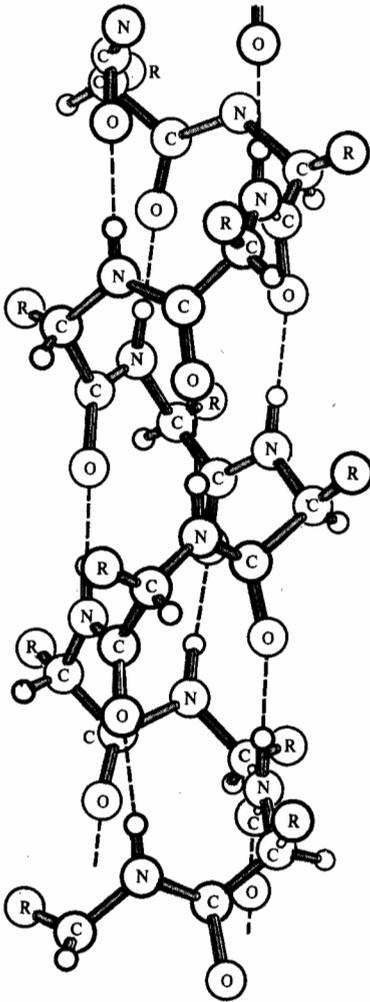


Рис. IX.6.
Схема α -спирали белковой молекулы

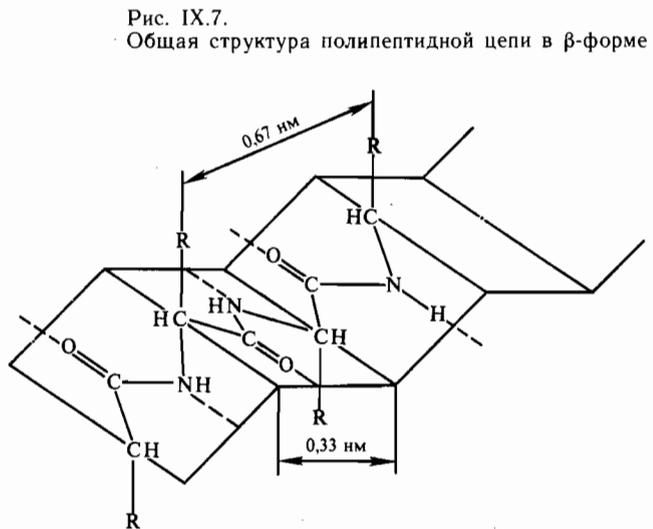


Рис. IX.7.
Общая структура полипептидной цепи в β -форме

ричной структуре белка. Первичная структура представляет собой аминокислотную последовательность белка, а третичная—соответствует набору взаимодействующих между собой регулярных конформаций.

Некоторые природные аминокислоты стабилизируют α -спираль (*ала, гли, мет* и др.), другие, наоборот, дестабилизируют (*вал, сер, цис* и др.). Разрушение спирализации происходит за счет невыгодных стерических контактов

между спиральной цепью и боковыми цепями, имеющими разветвление при атоме C^β (вал). Другая причина связана с образованием между амидной группой основной цепи и γ -гетероатомом в боковой цепи сильной водородной связи, которая может конкурировать с внутривещечной водородной связью между пептидными группами.

В качестве примеров пространственных белковых структур можно привести миоглобин, где 80% аминокислотных остатков составляют восемь правых α -спиралей, а также гемоглобин, состоящий из четырех глобул: двух β - и двух α -субъединиц. Наряду с α - и β -структурами доля неупорядоченных областей в молекуле белка составляет в ряде случаев до 50—60%. Это указывает на то, что регулярные участки в молекуле белка далеко не всегда доминируют, а третичная структура не всегда полностью насыщена водородными связями.

Определение конформационной энергии. Определение конформационной энергии больших участков белковых структур весьма сложно, оно связано с учетом всех взаимодействий и будет обсуждаться в последующих разделах. Здесь будут рассмотрены лишь отдельные участки полипептидной цепи. Важно отметить, что потенциалы заторможенного внутреннего вращения (E_0) вокруг единичных связей, примыкающих к атому C^α аминокислотного остатка, весьма малы (~ 42 кДж/моль) и сравнимы с величиной $k_B T$. Следовательно, минимумы отдельных дискретных состояний, возникающих при изменении углов φ и ψ , разделены невысокими энергетическими барьерами, которые могут быть компенсированы другими вкладами в конформационную энергию. Поэтому нельзя использовать поворотнo-изомерное дискретное приближение и расчет конформационной энергии, определяемой вращением связей i -го остатка полипептидной цепи, необходимо вести по формуле (VIII.3.3).

С учетом ван-дер-ваальсова взаимодействия (VIII.1.16) потенциала внутреннего вращения (VIII.3.3) и электростатических эффектов (VIII.2.2) конформационная энергия имеет вид

$$E(\varphi, \psi) = \sum_{k,l} E_{k,l}(\varphi, \psi) + E_\varphi^0(1 - \cos 3\varphi)/2 + E_\psi^0(1 - \cos 3\psi)/2 + E_{\text{эл.стат}}, \quad (\text{IX.1.1})$$

где члены $E_{k,l}(\varphi, \psi)$ определяются потенциалом Букингема (VIII.1.15) с расстояниями между атомами $r_{k,l}$, зависящими от φ и ψ .

Конформационная энергия молекулы в (IX.1.1) представляется суммой отдельных видов взаимодействий в попарно-аддитивном приближении, когда каждая пара атомов взаимодействует независимо от их внутримолекулярного окружения. Оптимум потенциальной энергии и соответствующее ему конформационное состояние находят путем минимизации функции $E(\varphi, \psi)$ при вариации значений двугранных углов вращения вокруг единичных связей. Естественно, учитывая большой объем вычислений, эта задача может быть решена только с помощью ЭВМ. Определение конформационных состояний отдельных аминокислотных остатков по формуле (IX.1.1) представляет собой необходимый и важный этап на пути построения конформационных карт пространственной структуры белка. Конформационное состояние отдельно взятого аминокислотного остатка определяется взаимодействием атомов боковой цепи данного остатка с прилегающими пептидными группами. Вычисления для аминокислот с длинными боковыми цепями связаны с необходимостью учитывать как вращение вокруг их единичных связей (связи $C_\alpha - C_\beta$ и $C_\beta - C_\gamma$), так и взаимодействие соседних боковых цепей. Барьеры вращения в боковых цепях (углы χ) зависят от природы атомных групп. Для алифатических групп $E_\chi \sim 12,6$ кДж/моль, а для фенильной группы в боковой цепи $E_\chi \sim 2,52$ кДж/моль (Г. Шерага, 1968).

Удобными объектами для изучения этих взаимодействий являются метиламиды N-ацетил- α -аминокислот ($\text{CH}_3\text{—CO—NH—CHR—CO—NH—CH}_3$), где R—радикал, соответствующий боковой цепи аминокислотного остатка. На рис. IX.8 приведена молекула метиламида N-ацетил-L-аланина ($\text{R}=\text{CH}_3$) в плоской конформации с нулевыми значениями двугранных углов $\varphi(\text{N—C}^\alpha)$, $\chi(\text{C}^\alpha\text{—C}^\beta)$, $\psi(\text{C}^\alpha\text{—C}^\beta)$ и углом $\omega=180^\circ$ ($\text{C}'\text{—N}$).

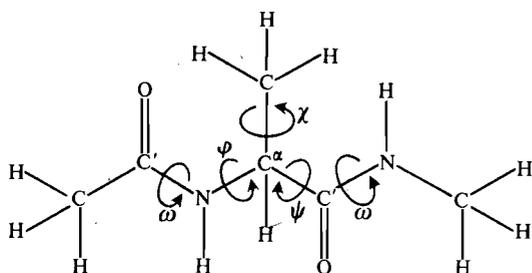


Рис. IX.8.
Молекула метиламида-N-ацетил-L-аланина в плоской конформации (объяснение см. в тексте)

На рис. IX.9 представлена диаграмма поверхности конформационной энергии в функции углов φ и ψ (Рамачандран). Видно наличие четырех областей низкой энергии, минимумы которых лежат в областях, окаймленных контурами 4—8 кДж/моль. Аналогичная картина была получена и для других молекул с одним аминокислотным остатком при оптимальных состояниях боковых цепей. Рассчитанные теоретические конформационные состояния отдельных метиламидов N-ацетил- α -аминокислот подтверждены экспериментально.

Это доказывает справедливость изложенных выше (IX.1.1) методов учета взаимодействий атомов в пределах одного аминокислотного остатка. Таким образом, конформация полностью определяется при постоянных

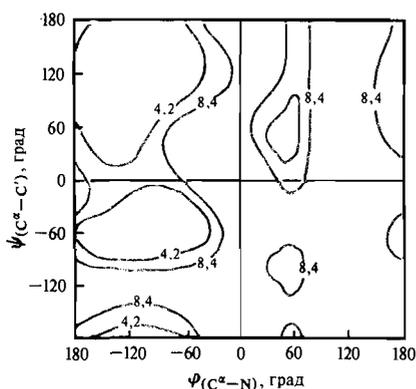


Рис. IX.9.
Диаграмма потенциальной поверхности молекулы метиламида-N-ацетил-L-аланина (цифрами указана энергия конформации, кДж/моль) (по Е. М. Попова, 1981)

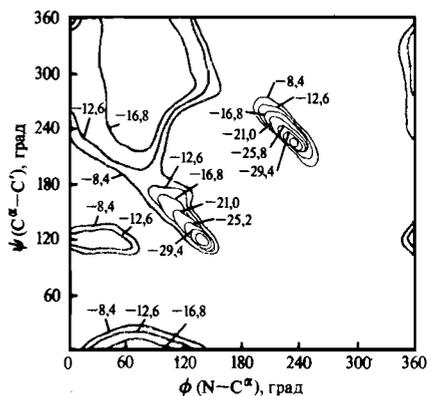


Рис. IX.10.
Карта конформационной энергии поли-L-аланина (энергии конформации указаны так же, как на рис. IX.9) (по А. G. Walton, J. Blackwell, 1973)

длинах связей и валентных углах значениями двугранных углов (φ , ψ , χ , ω).

Подобные расчеты были проведены также для более сложных систем и, в частности, полипептидов. На рис. IX.10 приведена диаграмма конформа-

ционной энергии для поли-L-аланина с учетом внутримолекулярных водородных связей. Области минимумов ($\varphi=240^\circ$, $\psi=240^\circ$ и $\varphi=120^\circ$, $\psi=120^\circ$) принадлежат левым и правым α -спиралям, причем энергетический минимум последней на $\sim 0,84$ кДж/пептид более устойчив. В верхнем левом углу диаграммы расположена область складчатых параллельных ($\varphi=61^\circ$, $\psi=239^\circ$) и антипараллельных ($\varphi=380^\circ$, $\psi=325^\circ$) β -структур, стабилизированных за счет межмолекулярных водородных связей. Карта конформационной энергии поли-L-аланина (рис. IX.10) в общих чертах сходна с таковыми для других полиаминокислот, где нет замещения по C^β -атому (поли-L-лейцин).

В целом можно заключить, что существующие в настоящее время методы расчета позволяют с достаточной степенью точности учесть наиболее существенные межатомные невалентные взаимодействия и тем самым определить энергетически оптимальные конформации сравнительно небольших по размеру участков полипептидной цепи. Однако, как будет показано ниже, в отношении пространственной структуры больших белковых молекул положение является гораздо более сложным.

§ 2. Пространственная организация белков

Основной особенностью пространственной структуры белка является способность полипептидной цепи образовывать детерминированную структуру, обладающую необходимыми динамическими свойствами для осуществления биологических функций.

Трехмерная структура белка в обычных физиологических температурных условиях строго центрирована, обладает большой средней плотностью $1,33\text{--}1,42$ г/см³, что несколько больше плотности твердого сухого белка и фактически приближается к плотности кристаллов низкомолекулярных органических соединений. Значения удельного объема белковых молекул в растворе приближаются к таковым для сухого белка и немного меньше, чем в случае синтетических полимеров.

В области строения белка молекулярная биофизика сталкивается с важной проблемой: в какой степени уникальность белковой структуры (вторичной и третичной) определяется первичной аминокислотной последовательностью. Эта проблема включает следующие вопросы: 1) определяет ли однозначно данная первичная последовательность структуру белковой глобулы при сворачивании цепи, т. е. насколько детерминирован сам процесс укладки белковой цепи в нативную форму; 2) возможна ли укладка случайной последовательности остатков в структуру, подобную нативной структуре белка; 3) каким образом возникли и были закреплены в ходе эволюции существующие природные первичные последовательности аминокислотных остатков.

Важность этой проблемы можно иллюстрировать простым расчетом. Известно, что число различных белков в природе составляет $\sim 10^5$. Каждый белок содержит около 200 аминокислотных остатков. В этом случае полное число различных последовательностей с 20 разными аминокислотными остатками составит 20^{200} , что неизмеримо больше, чем число белков, отобранных природой ($20^{200} \gg 10^5$). Уже в первых работах (Р. Ламри, Г. Эйринг, 1954) было указано на связь между характером аминокислотной последовательности и нативной конформацией белка, обладающей минимальной свободной энергией. Об этом же свидетельствовали и опыты по обратимости перехода белков (рибонуклеаза) из денатурированного состояния в нативную конформацию с восстановлением всех дисульфидных связей.

В современных исследованиях делают попытки предсказать на основе конкретной аминокислотной последовательности вторичную и третичную

структуры белка. Существенной задачей является также описание путей сворачивания первичной полипептидной цепи с образованием участков вторичной (α - и β -формы), а затем и третичной (глобула) структуры белка. Существуют в основном два подхода к решению этой проблемы.

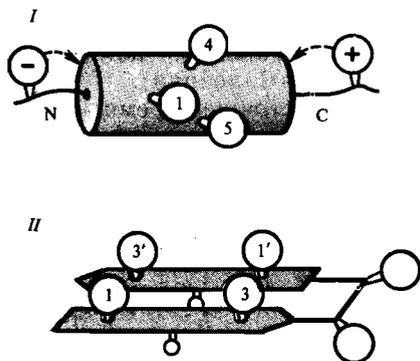


Рис. IX.11.

Типичное распределение аминокислотных остатков в α -спирали (I) и β -шпильке (II) (по О. Б. Птицыну, А. В. Финкельштейну, 1979)

Кружки с номерами означают гидрофобные группы, причем номера отражают их взаимное расположение в цепи. Кружками с «+» и «-» обозначены заряженные группы. На концах спирали стрелками указаны водородные связи, которые могут возникать между полярными боковыми группами и открытыми NH-группами N-конца спирали и CO-группами C-конца спирали

Эмпирический метод составляет сущность подхода, который хорошо развит в настоящее время. Он основан на выявлении корреляции между вторичной структурой участка белка и его аминокислотным составом и последовательностью. Исходя из этих корреляций сформулированы эвристические принципы организации белковых молекул, пространственного строения белка и полипептидов, а также эмпирические правила построения белка и сворачивания пептидной цепи с образованием вторичной и третичной структур. Экспериментальной базой этих правил стали результаты рентгеноструктурного анализа глобулярных белков в кристаллическом состоянии, близком к нативному.

Как правило, кристаллизация существенно не влияет на конформацию белка, тем более что в белковых кристаллах могут осуществляться многие ферментативные реакции. В глобулярных белках присутствуют полярные и неполярные группы в боковых цепях. Общая топография белковой глобулы определяется тем, что на ее поверхности в основном расположены полярные группы, связанные с водой электростатическими и водородными связями, а неполярные группы находятся внутри глобулы и образуют ее гидрофобное ядро (см. § 4 этой главы). Внутримолекулярные водородные связи между пептидными группами основной цепи являются важнейшим фактором, стабилизирующим глобулу. Гидрофобные группы образуют целые гидрофобные области на поверхности основных сегментов вторичной структуры: α -спиралей и β -структур. Тем самым длина каждого структурного сегмента определяется размером гидрофобной поверхности или числом гидрофобных групп, включенных в его состав.

На рис. IX.11 приведена схема распределения аминокислотных остатков в α - и β -участках, обогащенных гидрофобными группами, в то время как соединяющие их изгибы и петли преимущественно содержат короткие полярные группы, заряженные группы, остатки глицина и пролина (О. Б. Птицын, В. И. Лим, А. В. Финкельштейн). В средней части спирали во внутренних ветвях находятся преимущественно гидрофобные остатки (*ала; лей*). Остатки с отрицательными и положительно заряженными боковыми цепями локализируются соответственно на N- и C-концах.

Различные типы белковых структур, образованных из структурных сегментов, составляют структурную иерархию, изображенную на рис. IX.12. По-видимому, эта иерархия белковых структур отражает также и последовательность стадий при блочном механизме сворачивания белка. Это значит, что предсказание сегмента вторичной структуры из первичной последовательности равносильно расшифровке начальной стадии сворачивания белковой глобулы из полипептидной цепи.

Эмпирический стереохимический метод предсказания вторичной структуры (В. И. Лим) основан на распределении по поверхности участка вторичной структуры аминокислотных остатков трех типов: гидрофобных боковых групп, длинных полярных боковых цепей и коротких полярных боковых групп. Постулируют, что реально осуществляется только такое распределение этих остатков, при котором на поверхности α -спиралей и β -участков образуются сплошные гидрофобные области. Это справедливо для гидрофобных остатков, занимающих в боковой цепи положения 1—5, 1—2—5, 1—4—5, а также 1—4 или 1—2 на поверхности α -спирали и положение 1—3 для β -структур.

На основе простых стереохимических соображений можно видеть, что гидрофобные группы данной α -спирали или β -участка включают в промежутках между собой гидрофобные группы других участков, создавая тем самым плотное гидрофобное ядро белка. Последнее экранируется от воды и стабилизируется также длинными гидрофобными группами, расположенными на краях гидрофобной области. Короткие полярные группы, расположенные там же, наоборот, дестабилизируют данный структурный сегмент.

Дедуктивный метод предсказания вторичной структуры белка дает правильные результаты примерно в половине случаев. 20 рассмотренных таким методом белков (3100 остатков) в α -спиралях содержат 1145 остатков, из них правильно предсказано 590, неправильно—555, в β -структурах находится 425 остатков, 124 из которых определены правильно.

Статистические корреляции между первичной и вторичной структурами используют для установления связи между частотами появления тех или иных аминокислот и степенью стабилизации α -спиральных участков. Обширное статистическое исследование структуры белков позволило определить частоту появления каждого остатка в α -спиралях, внутренних витках α -спиралей, β -структурах и клубках без учета взаимодействий между остатками.

В других исследованиях особое внимание обращается не только на природу данного остатка, но и на характер и частоту появления соседних с ним в цепи остатков. Тем самым учитывается стабилизирующая роль взаимодействий остатков внутри участка вторичной структуры. Действительно, в третичной структуре миоглобина, гемоглобина, лизоцима, рибонуклеазы и химотрипсина содержатся определенные пентапептидные и тетрапептидные последовательности, которые присутствуют в спиральных областях. В ряде слу-

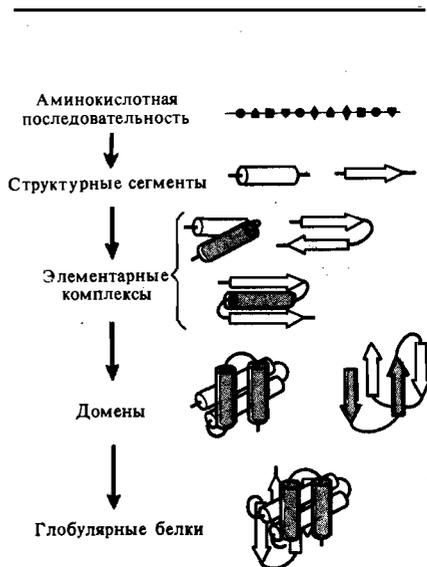


Рис. IX.12.

Иерархия структуры белка и последовательность его сворачивания (по О. Б. Птицину, А. В. Финкельштейну, 1979)

чаев при анализе α -структур оказалось необходимым учитывать взаимодействия в нонапептидном, а для β -участков— в пентапептидном фрагментах. Вместе с тем на основе статистического анализа структуры девяти белков был сделан вывод, что взаимодействия боковых групп с непосредственно примыкающими участками основной цепи могут играть также большую роль, подчас более важную, чем взаимодействия между отдельными боковыми группами.

Самоорганизация белка. Определенный характер распределения гидрофобных групп в развернутой цепи способствует образованию в ней α - или β -струк-

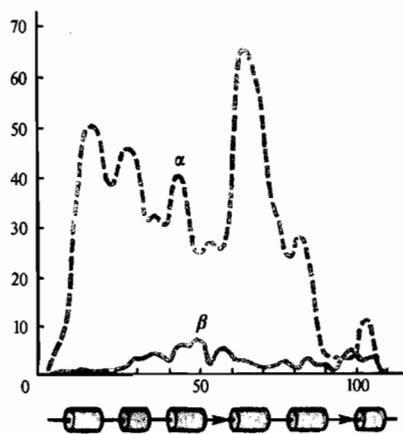


Рис. IX.13.

Вторичная структура развернутой цепи кальций-связывающего белка мышц карпа на 1-й стадии самоорганизации (по О. Б. Птицыну, А. В. Финкельштейну, 1979)

Ось абсцисс — номера остатков в белковой цепи, оси ординат — вероятность α -спирального (пунктир) и β -структурного (сплошная линия) состояния для каждого остатка цепи. Внизу показана экспериментальная локализация α -спиралей (цилиндры) и β -участков (стрелки)

турных участков в основном за счет локальных взаимодействий внутри данного участка. Одновременно за счет дальних взаимодействий структурного сегмента с другими участками белковой цепи обеспечиваются ее стабилизация и встраивание в белковую глобулу. Это приводит к тому, что образованные в развернутой цепи наиболее вероятные структурные сегменты вторичной структуры определяют и структуру целой компактной глобулы, возникающую при сворачивании первичной последовательности. Вместе с тем для α -спиральных белков α -спиральная структура уже доминирует в развернутой цепи, а β -структура доминирует в развернутой цепи β -структурных белков.

Так, для кальций-связывающего белка мышц карпа с доминирующей α -структурой в сформированной глобуле локальные максимумы вероятности образования спиральных участков в развернутой последовательности соответствуют гидрофобным участкам цепи со «спиральным» распределением гидрофобных, иницирующих и терминальных полярных групп. Уже на первых этапах самоорганизации в этом белке вторичной структуры α -спирали подавляют β -структуру практически по всей длине цепи (рис. IX.13). Аналогичная картина наблюдается и у β -структурных белков (рибонуклеаза А), где β -структура доминирует с самого начала самоорганизаций. Конечная структура белковой глобулы является результатом направленного процесса сворачивания цепи с предсуществующими структурными сегментами.

Описаны различные, пока еще далекие от завершения, молекулярные модели образования третичной структуры белка, в которых учитываются стереохимические особенности α - и β -структур. Например, α -спирали должны упаковываться так, чтобы боковые группы одной спирали («хребты» в положениях 1—5 и 1—4) входили в промежутки («ущелья» в положении 1—2) между боковыми группами другой спирали. Структурные сегменты соединены,

как правило, гидрофобными участками цепи, где отсутствуют гидрофобные связи между сегментами. Именно в «слабых» точках комплекс может «переломиться» с образованием компактной структуры, состоящей уже из коротких нативных структурных сегментов.

Вторичная структура служит блоком при формировании третичной структуры и должна поэтому быстро образовываться и быть относительно стабильной, чтобы «прожить» достаточно долго. Начало формирования третичной структуры связано с образованием иницирующей шпильки из соседних по цепи сегментов. Это требует фиксации структуры двух структурных сегментов и большой затраты энергии и поэтому невыгодно с энергетической точки зрения.

Дальнейший рост третичной структуры осуществляется путем присоединения соседних участков вторичной структуры и фиксацией структуры только одного сегмента. При этом не происходит большой потери свободной энергии и поэтому в конечном итоге более выгодные энергетически стадии роста могут скомпенсировать невыгодные стадии инициации при образовании компактной третичной структуры. Однако промежуточные, частично свернутые структуры, в которых эта компенсация еще не успела произойти, должны быть менее стабильны, чем конечная компактная структура. Все это в целом обуславливает направленный характер процесса сворачивания белковой глобулы, который протекает через небольшое число относительно стабильных промежуточных комплексов, образованных за счет кооперативных взаимодействий в белковой цепи. Направленность сворачивания исключает перебор всех возможных вариантов промежуточных, частично свернутых состояний, для чего потребовалось бы время неизмеримо большее, чем реальное время сворачивания белковой глобулы (несколько секунд).

Таким образом, можно считать, что процесс самоорганизации белка состоит по крайней мере из трех стадий (О. Б. Птицын). Формирование флуктуирующих зародышей вторичной структуры, стабилизированных главным образом водородными связями в главной цепи, происходит на первой стадии. На второй стадии из этих зародышей формируется промежуточная компактная структура белковой молекулы, где главную стабилизирующую роль играют гидрофобные взаимодействия неполярных боковых групп. Наконец, на третьей стадии формируется уникальная третичная структура белка, стабилизированная всеми основными видами объемных взаимодействий, включая стерическую комплементарность атомных групп.

Изложенный эмпирический метод, основанный на экспериментально установленных корреляциях между первичной последовательностью и структурой белка, выявляет общую направленность самоорганизации белковой глобулы и основан на представлениях о блочном характере строения белков. Строго говоря, здесь не учитываются в явном виде энергия и механизмы взаимодействия между соседними остатками в основной цепи. Это, в частности, относится и к конформациям боковых цепей, составляющих по числу атомов $\frac{2}{3}$ всего белка, для которых недостаточно эмпирических корреляций их структурного положения. В эмпирическом методе ставится на первом этапе задача предсказания в общих чертах модели всего белка с последующим ее уточнением путем минимизации энергии при вариации степеней свободы. Очевидно, дальнейший прогресс на этом пути может быть достигнут при накоплении большого экспериментального материала и соответствующих статистических корреляций между аминокислотной последовательностью и особенностями белковой структуры. Не меньшее значение имеют разработка методов обобщенного топологического описания структур белковых молекул и создание на этой основе алгоритмов процесса самоорганизации.

Метод физического моделирования структуры белка основан на поэтапной оценке взаимодействий валентно не связанных атомов между собой и с растворителем. Предполагают, что нативная конформация белка отвечает минимуму свободной энергии и характеризуется согласованностью между всеми видами внутримолекулярных взаимодействий. Последние превалируют над межмолекулярными взаимодействиями. Непосредственное предсказание наиболее стабильной конформации белковой молекулы путем минимизации суммарной энергии всех видов взаимодействий невозможно вследствие непреодолимых математических трудностей. Они состоят в исключительно большом числе возможных конформаций белка и, следовательно, столь же большом числе локальных минимумов. Это делает поиск глобального минимума свободной энергии сразу для всей белковой молекулы практически невыполнимым.

Так, если считать, что в среднем каждый аминокислотный остаток из n их общего числа в белковой цепи обладает 10 низкоэнергетическими формами, то общее число структурных вариантов составляет 10^n . Такие расчеты можно выполнить с помощью ЭВМ только для 5—6-членного пептидного фрагмента. Очевидно, единственным правильным путем здесь является поэтапное рассмотрение отдельных видов взаимодействий, определяющих конформацию каждого остатка с ближайшими, соседними и удаленными по цепи остатками.

Учет ближних взаимодействий с ближайшими пептидными группами был выполнен на молекулах метиламидов ацетиламинокислот (см. рис. IX.8). Ближние взаимодействия задают набор низкоэнергетических конформаций свободного монопептида, а средние и дальние—определяют уже выбор тех конформаций из этого набора, которые включаются в нативную структуру белка. Вследствие согласованного характера взаимодействий в белке средние и дальние взаимодействия не «портят» выгодной низкоэнергетической конформации монопептида. Поэтому низкоэнергетические состояния свободных остатков автоматически должны войти в состав низкоэнергетических состояний фрагментов. В свою очередь, это предполагает наличие структурных особенностей у свободных фрагментов, удовлетворяющих средним и дальним взаимодействиям в глобуле.

Иными словами, детерминированность механизма и кооперативный характер самоорганизации белковой глобулы должны приводить к энергетической дифференциации и появлению низкоэнергетических конформационных состояний на ранних стадиях самосборки. Отсюда следует, что на первом этапе расчета необходимо учитывать весь набор низкоэнергетических состояний свободных остатков, из которых затем происходит отбор для включения в нативную структуру.

Конформационное состояние остатка характеризуется определенными значениями двугранных углов вращения, задающих соответственно низкоэнергетические области на стерических картах. На следующем этапе учитывают небольшое число низкоэнергетических состояний олигопептидов (трипептид $n-1, n, n+1$) на основе известных конформационных состояний составляющих его фрагментов дипептида $n-1, n$ и $n, n+1$. Расчеты показывают, что взаимодействия остатков в дипептиде приводят к заметной энергетической дифференциации оптимальных форм каждого из них. В то же время наиболее предпочтительные конформации трипептида представляют собой комбинации низкоэнергетических форм смежных дипептидов, что свидетельствует о согласованности три- и дипептидных взаимодействий.

Конформационный анализ более сложных олигопептидов проводят методом последовательного увеличения цепи на один остаток. Рассчитывают все комбинации, составленные из наиболее выгодных состояний вновь образованной пептидной пары ($n+1, n+2$) и предпочтительных состояний

уже рассмотренного фрагмента ($n-1$, n , $n+1$). Новые взаимодействия, возникающие при удлинении цепи, стабилизируют фрагмент и не нарушают уже сложившихся взаимодействий, что является прямым следствием общей согласованности всех типов взаимодействий. Учет конформационных возможностей свободных фрагментов ведет к идентификации в первичной последовательности жестких структур-нуклеаций, которые стабилизируются дальними взаимодействиями (появление таких нуклеаций предполагают и в эмпирическом подходе). Одновременно с этим под действием средних и дальних взаимодействий образуются и лабильные участки белковой последовательности с определенным набором выгодных конформационных состояний.

Таким образом, в предложенном методе расчёта нахождение наиболее стабильной конформации белковой молекулы сводится к решению «блочной» задачи — поиску оптимальных условий упаковки жестких блоков при вариации низкоэнергетических состояний лабильных частей цепи, известных из анализа ближних и средних взаимодействий. Как видно, здесь используют ту же идею о детерминированном и последовательном характере самоорганизации белковой глобулы, что и в эмпирическом методе. Однако вместо статистических корреляций между первичной последовательностью и структурой глобулы в предложенном методе используют непосредственный расчёт внутримолекулярных взаимодействий и принцип минимума энергии как критерий оптимальности упаковки.

Конкретные расчёты основаны на анализе атом-атомных взаимодействий, включающих невалентные, электростатические, торсионные взаимодействия и водородные связи. В качестве примера рассмотрим данные по изучению пространственного строения и конформационных возможностей фрагмента *арг-1—цис-38* молекулы бычьего панкреатического трипсинового ингибитора (БПТИ), включающей 58 остатков с известной аминокислотной последовательностью (Е. М. Попов). На первом этапе рассчитывали структуры трипептидов *ала-25—ала-27, лей-29—гли-31* и *фен-33—тир-35*, тетрапептида *ала-25—гли-28*. Полученные результаты позволили рассчитать конформации фрагментов *асн-24—лей-29, глн-31—тир-35* и *фен-22—глн-31*. Наконец, это позволило составить стерическую карту участка *фен-22—тир-35* (рис. IX.14). Были выделены наиболее выгодные по энергии состояния, которые использовали при последующем рассмотрении конформационных возможностей более крупных фрагментов.

Эффективность подобного подхода демонстрирует тот факт, что для гексапептида *асн-24—лей-29* из 768 вариантов удалось выделить всего 17 предпочтительных конформаций с относительной энергией в интервале от 0 до 21 кДж/моль; для фрагмента *фен-21—глн-31* из 408 вариантов, полученных после процедуры минимизации в интервал 0—21 кДж/моль, попал лишь один структурный тип, а в интервал до 33,6 кДж/моль—10 типов. Рассмотрение данных структурных типов совместно с фрагментом *глн-31—тир-35* позволило еще более сократить число возможных конформационных состояний для всего фрагмента *фен-22—тир-35*, состоящего из 14 остатков (рис. IX. 15). Эти данные использовали в дальнейшем для выбора предпочтительных конформаций при совместном рассмотрении с семью возможными конформациями, полученными ранее при расчете структуры другого фрагмента *арг-1—тир-21*.

Совместное рассмотрение структуры двух указанных фрагментов *фен-22—тир-35* и *арг-1—тир-21* позволило выделить участок антипараллельной β -структуры, разные направления которой принадлежат разным фрагментам. Дальнейший анализ включал выбор возможных конформационных состояний фрагмента при присоединении трипептидного участка *тир-35—гли-37*.

Сложная задача возникла при согласовании двух рассчитанных фрагментов, поскольку при этом обнаружены стерические препятствия. Еще более

сложные ситуации могут возникнуть при переходе к глобулярным белкам, где число граничащих блоков должно резко возрасти. Возможно, именно стерические препятствия служат одним из факторов, определяющих появление у белков гетерогенной по плотности структуры. Для устранения стерических препятствий были использованы вариации двугранных углов у различных остатков. На основе минимизации энергии при вариации двугранных углов

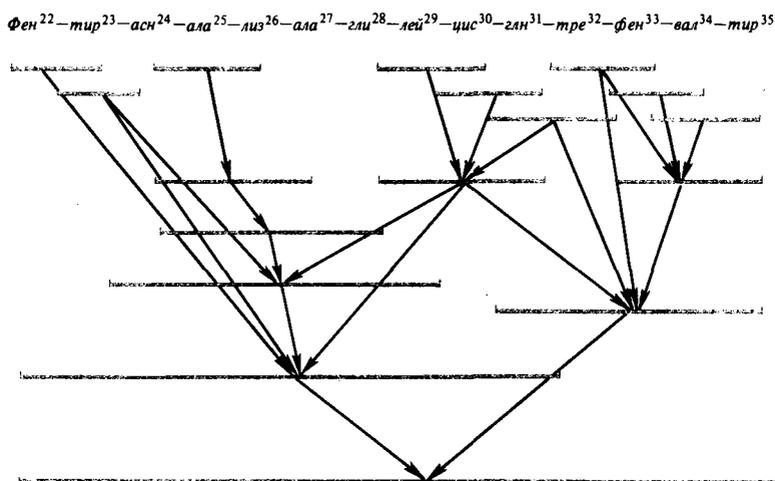


Рис. IX.14.

Последовательность учета межпептидных взаимодействий при расчете фрагмента фен-22—тир-35 молекулы БПТИ (по Е. М. Попову, 1981)

удалось устранить все неблагоприятные стерические контакты, оставаясь в пределах низкоэнергетических конформационных карт. Полученная пространственная структура с точностью до 0,1 нм совпала с экспериментально определенной геометрией этого участка. Хорошее совпадение было получено и для 215 двугранных углов.

Эти данные показывают, что метод полуэмпирического конформационного анализа может быть успешно использован для определения пространственной структуры достаточно сложных полипептидов, включающих по крайней мере четыре десятка аминокислотных остатков, оставаясь в рамках первоначально отобранных наиболее выгодных конформационных состояний свободных пептидов. Однако при расчете достаточно больших биополимеров приходится накладывать дополнительные ограничения, делая априорные предположения о возможной структуре белка.

Проблема уникальности структуры белка. Итак, первичная последовательность аминокислотных остатков образует глобулярную конформацию, в которой при большой плотности звеньев отсутствуют тем не менее перекрытия пар отдельных единиц. Общим условием является также определенное топографическое расположение полярных и гидрофобных боковых цепей на поверхности и внутри глобулы.

Удовлетворение этих достаточно жестких требований в сочетании с плотной нерегулярной конфигурацией и при отсутствии большого числа остатков в конформациях с высокой энергией обуславливает уникальный характер

белковой глобулы. Определенная конформация данной полипептидной цепи в глобулярном белке является в этом смысле действительно исключительным явлением, а не просто одной из многих возможных конформаций, лишь слегка различающихся по энергии. Согласованность ближних и дальних взаимодействий обеспечивает направленный характер самосборки глобулы при зарождении элементов будущей вторичной структуры уже на ранних стадиях сворачивания. Для обеспечения этого необходимо, чтобы в цепи возникали регулярные (α - и β -) участки, имеющие хотя бы одну непрерывную гидрофобную поверхность. Это условие является «грубым». Более «тонкие» свойства структуры функциональных белков связаны с определенным расположением остатков на поверхности для топографической совместимости белков вторичной структуры, с наличием гидрофобных и гидрофильных поверхностей на разных сторонах некоторых α -спиральных участков.

Эти условия накладываются, как может показаться, жесткие требования на «подходящие» для белка аминокислотные последовательности. В случае их справедливости данные последовательности стали бы критерием, по которому в процессе эволюции специально отбирались бы именно существующие природные последовательности.

Однако детальный теоретический анализ и прямые эксперименты, проведенные в последнее время (О. Б. Птицын, 1985), показали, что почти такой же способностью формировать α - и β -участки с непрерывными неполярными поверхностями обладают и случайные последовательности полярных и неполярных остатков. При синтезе случайных последовательностей достаточно длинные неполярные кластеры также возникают в цепи с некоторой вероятностью, хотя в природных цепях они, конечно, определяются генетическим кодом. В обоих случаях возникшие неполярные сгущения затем слипаются своими непрерывными неполярными поверхностями. Распределение α - и β -участков по длинам и по α - и β -конформациям в случайных последовательностях близки к соответствующим распределениям в реальных глобулярных белках. Это было показано, в частности, на статистических сополимерах глутаминовой кислоты с лейцином. Кроме того, оказалось, что все наиболее распространенные типы укладки и топологии α - и β -участков в реальных белках (см. рис. IX.12) могут быть получены в химически однородных полипептидных цепях с неполярными остатками как энергетически наиболее стабильные структуры.

Все это свидетельствует о том, что для получения плотной упаковки белка нет необходимости задавать его первоначальную последовательность абсолютно однозначно. Этот вывод подтверждается и при рассмотрении белков с расшифрованными последовательностями. Известно, что белки (например, цитохромы), выполняющие одну и ту же функцию, но в разных организмах, существенно отличаются по своей первичной последовательности. Это же справедливо и в отношении ферментов—белков, выполняющих одну и ту же функцию, но на разных стадиях развития одного и того же организма. В таких

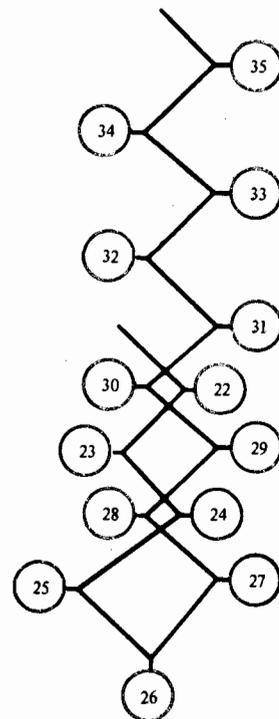


Рис. IX.15. Структурный план основной цепи в глобальной конформации фрагмента *фен-22—тир-35* (цифрами в кружках обозначены номера фрагментов)

белках многие аминокислотные остатки взаимозаменяемы, хотя во всех этих случаях третичные структуры белков остаются практически одинаковыми.

Вместе с тем существуют белки, имеющие сходные третичные структуры, но выполняющие разные функции. В отношении функциональных свойств белка ситуация, однако, уже иная. В активном центре белка (фермента) каждый аминокислотный остаток выполняет вполне определенные функции и заменить его каким-либо другим (без нарушения функции) невозможно. Но так как число «незаменимых» аминокислотных остатков в активном центре, как правило, невелико (не более 3—6), то их комбинации с некоторой вероятностью могли бы возникнуть и при случайном (генетически не контролируемом) синтезе белковых последовательностей. Однако возникает вопрос, насколько вероятен такой случайный одноактный синтез данного белка.

Для решения этого вопроса рассмотрим количественную сторону проблемы и попробуем оценить вероятность случайного синтеза белковой структуры. Получение количественной оценки возможно, если обратиться к информационному аспекту проблемы. Необходимо оценить количество ценной информации, требуемой для обеспечения заданной функции белка, и на основе этого определить вероятность его случайного синтеза.

Максимальное количество информации, содержащееся в цепи из 200 остатков, составляет (см. (VI.3.2))

$$I_{\text{B}}^{\text{max}} = \log_2 W; \quad I_{\text{B}}^{\text{max}} = \log_2 20^{200} = 860 \text{ бит.}$$

Вероятность случайного возникновения такой структуры исчезающе мала:

$$p = 1/W; \quad p_{\text{min}} = 2^{-I_{\text{B}}} \approx 10^{-240}.$$

Величина 860 бит, является максимальной, так как не все аминокислоты на самом деле строго фиксированы и незаменимы для выполнения белком своих функций. Можно дать предельную нижнюю оценку содержащейся в белке ценной информации, считая, что существенной является только фиксация аминокислот в активном центре. Тогда $I_{\text{B}}^{\text{min}} = \log_2 20^{\nu} = 4,3\nu$, где ν —число аминокислот в активном центре. При $\nu=5 \div 6$ $I_{\text{B}}^{\text{min}} \approx 20 \div 30$ бит, т. е. $I_{\text{B}}^{\text{min}} \ll I_{\text{B}}^{\text{max}}$. Вероятность случайного синтеза при этом максимальна: $p_{\text{max}} = 2^{-I_{\text{B}}^{\text{min}}} \sim 10^{-6}$.

Эта величина уже не так мала ($p_{\text{max}} \gg p_{\text{min}}$). Это означает, что синтез данного активного центра вполне мог произойти случайно во время эволюции. Разница между $I_{\text{B}}^{\text{max}}$ и $I_{\text{B}}^{\text{min}}$ и соответственно p_{min} и p_{max} очень велика. Очевидно, реальные оценки вероятности случайного возникновения функциональных белков лежат где-то в середине этого колоссального интервала. Они должны учитывать информацию, содержащуюся не только в активном центре, но и в участках и элементах структуры, характерных для данного белка.

Была предпринята попытка (Д. С. Чернавский) оценивать количество информации для бактериородопсина, который содержит семь спиральных участков и неспирализованных мостиков между ними (см. гл. XXIX). При этом учитывали наличие сплошных гидрофобных боковых поверхностей, обращенных к липидной мембране, необходимое расположение гидрофильных остатков в центре молекулы и наличие фиксированных остатков в активном центре. Оказалось, что реальная оценка составляет $I_{\text{B}}^{\text{реал}} \approx 90$ бит, а соответственно вероятность синтеза $p_{\text{реал}} \approx 10^{-30}$. Можно думать, что и другие белки содержат информацию того же порядка: ~ 100 бит.

Таким образом, необходимость синтеза не только самого активного центра, но и необходимых для его функции элементов структуры с заданными особенностями приводит к уменьшению вероятности случайного возникновения

функционального белка в $p_{\max}/p_{\text{реал}} = 10^{-6}/10^{-30} \approx 10^{24}$ раз. Все это свидетельствует о том, что, хотя и в произвольных последовательностях возможно образование элементов структуры белка, случайный синтез всего функционального белка не мог произойти сразу, «в один акт». Более вероятным представляется путь постепенного накопления информации и постепенного повышения ее ценности. Это означает, что хотя сами по себе отдельные структурные изменения могли возникать в белке случайно, но биологическое значение определилось уже последующими процессами отбора и воспроизведения. Именно в результате этого утвердилась биологическая уникальность структуры белка, что является иллюстрацией принципа биологического запоминания случайного выбора как условия создания ценной биологической информации (см. § 3 гл. IV). При этом за счет отсева альтернативных вариантов повышается ценность информации в структурах, оставшихся после «браковки».

Таким образом, на всех этапах эволюционных изменений структурно-функциональные взаимодействия приводили к совершенствованию молекулы белка, что находило свое конкретное выражение в строении и количестве закрепленной ценной информации.

Вопросы, связанные с возникновением биологических информационных систем, интенсивно разрабатываются, но многое еще остается неясным. Решение этих проблем будет иметь большое значение для понимания сущности и путей возникновения жизни.

§ 3. Особенности пространственной организации нуклеиновых кислот

Основная биологическая функция молекулы ДНК состоит, как известно, в хранении и передаче генетической информации, записанной в виде определенной последовательности нуклеотидов в двойной спирали (рис. IX.16). Поэтому связанное с этим основное требование к структуре ДНК—стабильность и сохранность генов—должно вполне определенным образом сочетаться с конкретными изменениями ее структуры, в частности в процессах взаимодействия с белками. Обычные тепловые флуктуации вызывают структурные изменения ДНК, не приводящие, однако, ни к разрыву водородных связей, ни к изменению межплоскостных расстояний между основаниями. В то же время спираль ДНК сохраняется при тепловых флуктуациях, а также и при более сильных внешних воздействиях. Для оценки потенциальных структурных возможностей ДНК большое значение имеют теоретические методы и модели. Они справедливы и когда необходимо оценить изменение структуры ДНК при ее участии в молекулярно-генетических процессах рекомбинации, репликации и транскрипции. Существует два ряда теоретических методов изучения структуры ДНК: методы построения упрощенных физических моделей, основанные на экспериментальных данных и отражающие совокупность свойств целостной молекулы ДНК, и методы конформационного анализа и квантовой химии.

Физические модели ДНК. В первой группе методов наибольшее значение имеют модель гибкого стержня и модель спираль — клубок.

В обычных полимерных цепях гибкость определяется поворотной изомерией (см. § 3 гл. VIII). Однако в модели, где ДНК представляется в виде упругого стержня, ее жесткость характеризуется двумя параметрами: жесткостью на изгиб оси и жесткостью кручения. Жесткость на изгиб оси двойной спирали определяет способность ДНК укладываться в вирусных частицах, хромосомах и т. д. Энергия изгиба цепочки, состоящей из $N+1$ звеньев или $N+1$ пар оснований, с углами $\Theta_1, \Theta_2, \dots, \Theta_N$ между звеньями имеет вид

$$E_b = (g_b / 2) \sum_{i=1}^N \theta_i^2, \quad (\text{IX.3.1})$$

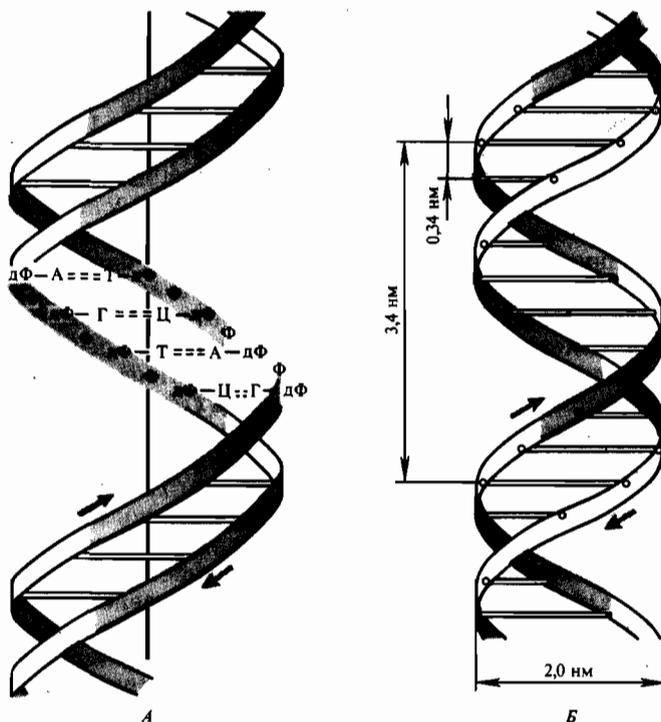
где g_b — константа жесткости на изгиб оси двойной спирали.

Как было показано (см. § 1 гл. VII), жесткость полимерной цепи связана с корреляцией в направлении звеньев и характеризуется персистентной длиной a (см. (VII.1.11), (VII.1.12)). Для нахождения связи между a и g_b зададимся средней энергией колебаний равной $k_B T$ и приравняем

$$g_b = a k_B T / l, \quad (\text{IX.3.2})$$

где l — длина звена. Отсюда, зная персистентную длину $a = 50,0$ нм, можно найти $g_b \approx 10^{-18}$ Дж.

Жесткость на кручение, или торсионная жесткость, ДНК определяется как изменение энергии при отклонении угла между соседними парами оснований от его равновесного значения. Согласно расчетам, числовое значение торсионной жесткости g_t для кольцевой полимерной цепи составляет $g_t = 0,036 k_B T$. При такой жесткости особое значение торсионная гибкость приобретает в случае замкнутых кольцевых молекул ДНК, состоящих из двух взаимно зацепленных одностебельных колец. В обычных условиях угол (36°) между осями пар оснований, соседних по длине двойной спирали ДНК, испытывает отклонение $\pm 5^\circ$ вследствие тепловых колебаний. В то же время для перехода между разными формами ДНК (В- и С-формы) достаточно изменения этого угла всего на $2,5^\circ$. Отсюда следует, что в пределах семейства одного типа форм (В-формы) происходят непрерывные переходы из одной



конформации в другую. По существу, разные участки одной и той же молекулы ДНК могут находиться одновременно в разных конформациях.

В модели гибкого стержня изменения конформации ДНК связываются с небольшим изгибом и кручением двойной спирали в каждой паре оснований, которые накапливаются на большой длине. В результате происходит непрерывное изгибание молекулы ДНК с образованием кольца диаметром около 10,0 нм. Согласно другой точке зрения, укладка двойной спирали при компактизации ДНК может происходить за счет редких изломов на большой угол вследствие нарушения межплоскостных (стекинг) взаимодействий между парами оснований (см. § 1 гл. VIII). Наряду с флуктуационными изгибами оси спирали и поворотами соседних пар оснований в ДНК может происходить и раскрытие отдельных пар оснований. Хотя этот процесс идет

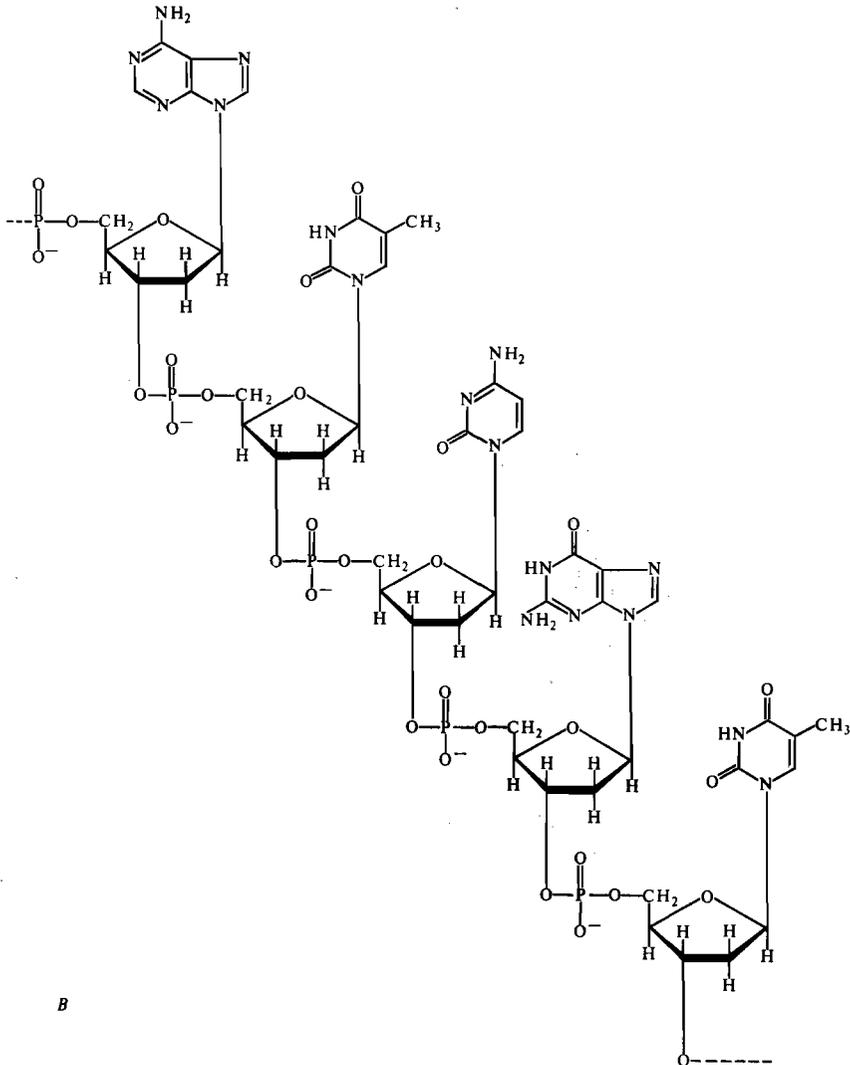


Рис. IX.16.
Строение ДНК. А, Б — двойная спираль, В — участок цепи ДНК

с очень малой вероятностью, тем не менее он приводит к сильным изменениям конформации и играет определяющую роль в реакциях ДНК с химическими агентами (например, с формальдегидом), которые могут реагировать лишь с раскрытыми нуклеотидами. Эти маловероятные, но значительные изменения структуры учитываются в моделях спираль—клубок, которые будут рассмотрены ниже. Здесь лишь необходимо отметить, что согласно модели спираль—клубок тепловые флуктуации могут приводить к раскрытию участков внутри

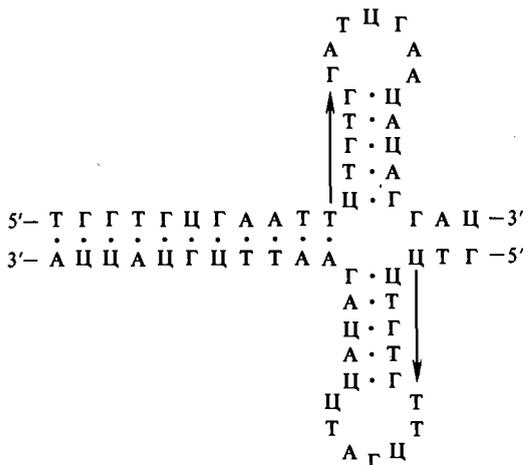


Рис. IX.17.
 Две конформации участка гена, детерминирующего дрожжевую фенилаланиновую тРНК (по Д. Мецлеру, 1980)

В области значений $-\sigma = 0,06 \div 0,08$ появляются крестообразные структуры, конкурирующие с расплавленными структурами и образующиеся при раскрытии целых участков ДНК

спиральной области и переходу пары оснований (А—Т или Г—Ц) из закрытого (спиральное) в открытое (клубкообразное) состояние. При обычных физиологических температурах в ДНК происходят в основном флуктуационные раскрытия отдельных пар оснований с вероятностями не более 10^{-5} . Вероятности одновременного раскрытия двух и большего числа пар оснований соответственно на один и два порядка меньше.

Особое значение изложенные выше представления приобрели в связи с проблемой функционирования в клетке сверхзакрученных кольцевых замкнутых ДНК. При закручивании нормального двуспирального комплекса общее число оборотов α одной нити относительно другой равно числу витков β в ненапряженной двойной спирали плюс число супервитков τ : $\alpha = \beta + \tau$.

Величина β всегда положительна, τ может быть и отрицательным, это левоспиральные супервитки, противоположные по знаку двойной спирали. Различные характеристики ДНК зависят от плотности супервитков (степень суперспиральности) σ , равной числу супервитков на 10 пар оснований в состоянии, когда все пары в двойной спирали закрыты. Для природных кольцевых молекул ДНК σ чаще всего отрицательна. Наиболее типичное значение $-\sigma = 0,05$ (~ 5 супервитков на 1000 пар оснований). С ростом плотности сверхспирали ($-\sigma$) вероятность раскрытия пары возрастает, причем наиболее резко от $\sim 9 \cdot 10^{-5}$ до 10^{-3} в области изменения плотности от 0,06 до 0,12. Здесь начинают раскрываться не только отдельные пары, но и более протяженные области (рис. IX.17). Плотность сверхспирализации $-\sigma$ не может превысить некоторого предельного значения ($-\sigma = 0,085$), поскольку дальнейшее

увеличение $-\sigma$ будет компенсироваться соответствующим раскрытием пар оснований в двойной спирали (М. Д. Франк-Каменецкий).

Конформационный анализ ДНК. В отличие от хорошо изученных переходов спираль—клубок переходы ДНК в пределах двухтяжевого состояния без разрыва комплементарных пар стали широко изучаться сравнительно недавно. Целью этих работ является выявление возможных форм ДНК и физических причин конформационных переходов внутри двухтяжевого состояния.

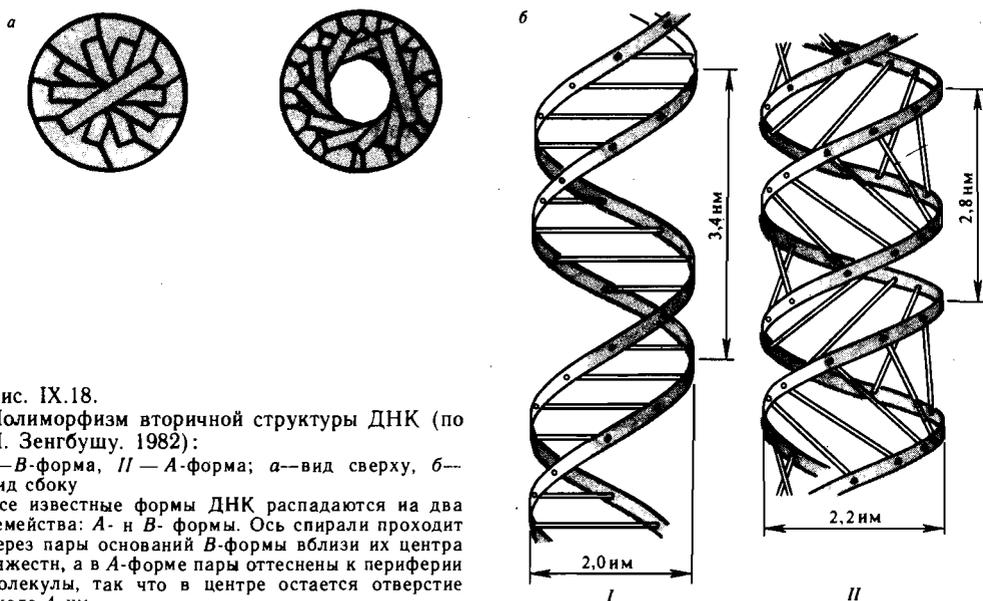


Рис. IX.18.

Полиморфизм вторичной структуры ДНК (по П. Зенгбушу. 1982):

I—B-форма, II—A-форма; а—вид сверху, б—вид сбоку

Все известные формы ДНК распадаются на два семейства: A- и B-формы. Ось спирали проходит через пары оснований B-формы вблизи их центра тяжести, а в A-форме пары отнесены к периферии молекулы, так что в центре остается отверстие около 4 нм

Важность этих задач очевидна с биологической точки зрения, поскольку в процессе функционирования ДНК может менять свою конформацию вследствие взаимодействия с другими компонентами клетки, прежде всего с белками. Двойная спираль нуклеиновой кислоты, обладая общей жесткостью по длине спирали, представляет собой вместе с тем своего рода шарнирное устройство с ограниченным числом вращательных степеней свободы вокруг единичных химических связей (рис. IX. 18, IX. 19). Общая геометрия спиральной молекулы описывается пятью параметрами (рис. IX.20), из которых наиболее важные: спиральное вращение τ —угол поворота между соседними парами и D —расстояние пары от оси спирали. Отличие A- и B-форм состоит в различии значений углов χ и σ (на 60°) и большими положительными значениями D и меньшими значениями τ у A-формы.

Основная причина всех этих различий связана с альтернативной геометрией сахарного кольца у форм B- и A-семейств. Фуранозное кольцо рибозы и дезоксирибозы неплоское. Обычно либо атом C2, либо атом C3 выходят из плоскости других четырех атомов кольца. Если данный атом выдвинут в сторону 5'-углерода и расположен выше кольца, т. е. находится от него со стороны основания, то кольцо обладает эндоконформацией. Если атом лежит ниже кольца, то получается экзоконформация (рис. IX.21). При изменении геометрии

сахара с С2'-эндо (С3'-экзо) к С-3'-эндо резко меняется расположение в пространстве выходящих из кольца связей, что и соответствует переходу от В- к А-формам. Наличие столь большого числа внутренних степеней свободы позволяет рассматривать двойную спираль как структуру, способную к непрерывному изменению своей геометрии. Недавно были получены новые результаты в теоретическом исследовании потенциальных возможностей комплементарной спирали (В. И. Иванов).

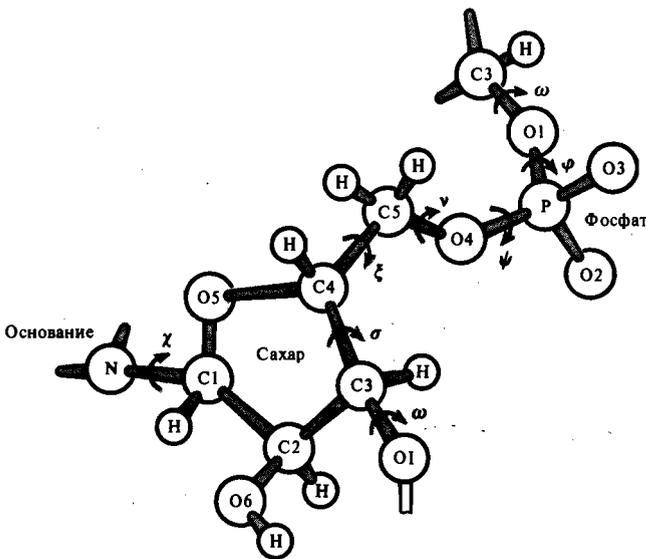


Рис. IX.19.

Обозначения атомов и двугранных углов повторяющейся единицы сахарофосфатной цепи

Конформация мономера нуклеиновой кислоты задается конформацией сахарного кольца, пятью углами вращения вокруг единичных связей в сахарофосфатной цепи ξ , ν , ψ , ϕ , ω и одним углом χ (N—C1, гликозидная связь), определяющим ориентацию основания относительно сахарного кольца

Основная трудность в решении задачи полного описания множества энергетически разрешенных конформаций двойных спиралей состоит в чрезвычайно большом переборе всех структурных вариантов в пространстве двугранных углов или параметров двойной спирали (см. рис. X.19; X.20). Область перебора сужается, если исходно задавать лишь «разумные» взаимоположения пар оснований, рассчитывать для них конформации сахарофосфатного остова. Оказывается, что для любого набора параметров оснований в случае регулярной спирали существует только конечное число конформаций сахарофосфатного остова. При заданном расположении оснований соединяющая их сахарофосфатная цепь является жесткой, однако при движении пар фиксированных оснований становятся возможными непрерывные переходы в пределах различных семейств форм. Непосредственно энергию спирали рассчитывают в виде суммы ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий с использованием потенциала Леннарда—Джонса (см. (VIII.1.16)) и значений $\epsilon \sim 4$.

Конформационная карта комплементарных спиралей приведена на рис. IX.22 в координатах (D, τ) . Она представляет собой проекцию 5-мерного пространства переменных параметров на плоскость (D, τ) , причем остальные параметры имеют такие значения, при которых энергия спирали является минимальной.

На карте изображены канонические семейства В и А, содержащие все известные модели форм двойной спирали. Энергетические «овраги», ограни-

ченные линиями равной энергии, соответствуют областям существования энергетически выгодных структур. Видно, что профиль энергии для В-«оврага» характеризуется довольно плоским дном в области $36^\circ \leq \tau \leq 42^\circ$.

Видимо, в реальных условиях электростатическое отталкивание фосфатов противоположных цепей стабилизирует формы с большей шириной сахарного желоба, что приводит к опытным значениям $\tau \leq 36^\circ$, т. е. меньшей закрученности спирали. Энергия А-форм в целом выше, а «яма» уже, чем у В-форм.

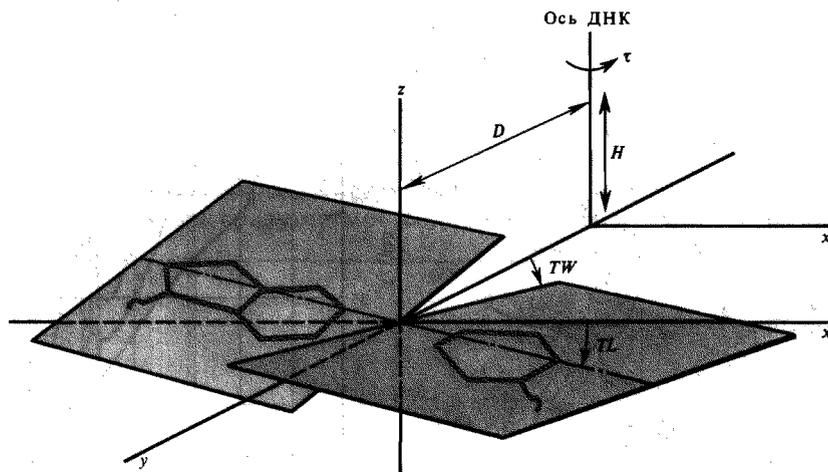


Рис. IX.20.

Пять параметров Арнотта, задающих расположение оснований в регулярной двойной спирали: поворот пар τ , расстояние от оси спирали D , наклон TL , «пропеллер» оснований в паре TW , проекция повторяющейся единицы на ось спирали H (по В. И. Иванову, 1980)

Это объясняется энергетически невыгодным вкладом кулоновых взаимодействий в А-формах, где расстояние между фосфатами одной и той же цепи примерно на 0,1 нм короче, чем в В-формах.

Конформационные черты энергетически оптимальных полимеров и тримеров В-области в отличие от А-области (см. рис. IX.22) не зависят от состава и последовательности оснований. Области значений углов сахарофосфатной цепи совпадают с областями наиболее вероятных значений двугранных углов в кристаллах фрагментов нуклеиновых кислот. В целом при полном учете всех внутримолекулярных взаимодействий В-форма оказывается единственной устойчивой формой ДНК, параметры спирали которой отвечают рентгенографическим данным. Перестройки спирали при конформационном переходе А→В могут происходить и без заметных пространственных напряжений с энергетическим барьером перехода меньше 12,6 кДж/моль на нуклеотидную пару.

Изложенные данные иллюстрируют плодотворность теоретических расчетов структур нуклеиновых кислот, занимающих все большее место в молекулярной биофизике. Будущие теоретические исследования должны, очевидно, включать в себя одновременно элементы физического моделирования и конформационного анализа. Это даст дополнительную информацию

о новых конформациях и, главное, о характере динамики структуры ДНК. Изучение амплитуды и энергии флуктуационных движений пар оснований относительно оси спирали, проведение точных расчетов жесткости и персистентной длины ДНК являются очередными задачами в этом направлении.

До недавнего времени рентгеноструктурный анализ ДНК ограничивали ориентированными волокнами. Разрешение на таком образце не достигало атомного уровня. Поэтому интерпретация данных требовала модельных пред-

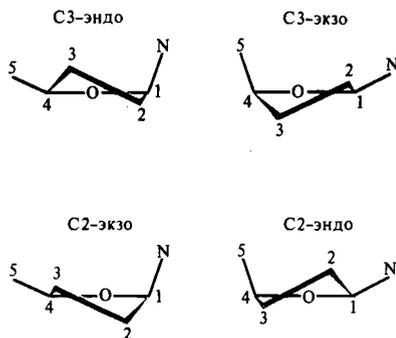


Рис. IX.21.

Четыре наиболее устойчивые конформации сахарного кольца в нуклеotide (по В. И. Иванову, 1980)

В *B*-формах присутствует *C2*-эндо- (*C3*-экзо) сахар; в *A*-формах — *C3*-эндо. При изменении геометрии сахара от *C2*-эндо (*S*-тип) к *C3*-эндо (*N*-тип) связи *C4*—*C5* и *C1*-*N*, занимающие вначале почти экваториальное и меридиональное положения соответственно меняют свою ориентацию на противоположную

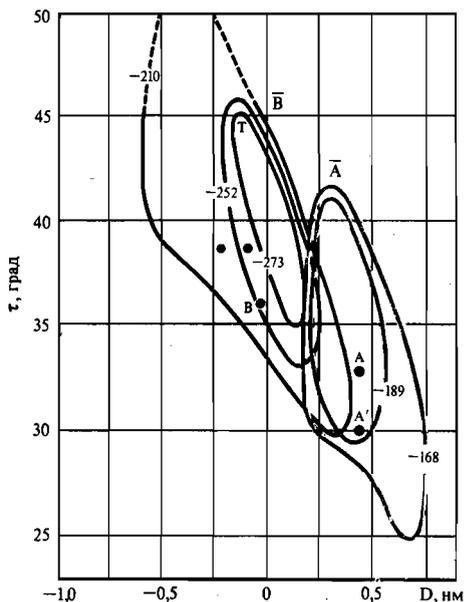


Рис. IX.22.

Карта (D , τ) для канонических семейств спиралей нуклеиновой кислоты (по В. И. Иванову, 1980)

Черными линиями обозначены семейства форм с *C2*-эндо-сахарами (*B*-форма), цветными линиями — с *C3*-эндо-сахарами (*A*-форма). Линии уровня маркированы величинами энергии в кДж/моль. Верхние части некоторых «оврагов» изображены точками, чтобы выделить области, в пределах которых спирали имеют очень узкий сахарный желоб (тот, в который входят гликозидные связи)

ставлений. В 1978 г. впервые были получены монокристаллы синтетического олигонуклеотида *CGCGCG/GCGCGC*. Рентгеноструктурный анализ показал, что этот дуплекс образует спираль с антипараллельными нитями и уотсон-криковскими парами оснований, закрученную, однако, влево и содержащую повторяющуюся единицу не одного, а двух нуклеотидов. Из-за этого сахаро-фосфатный остов имеет зигзагообразный вид. Структура получила название *Z*-формы. Эта форма может быть энергетически выгодна лишь при регулярном чередовании пуринов и пиримидинов. Ее характеризует средний поворот пар оснований— 30° , т. е. она имеет 12 пар на виток, закрученный влево. При

этом пары оснований сильно отодвинуты от оси, но в сторону, противоположную А-форме.

Многочисленные работы последних лет свидетельствуют, что в природных ДНК существуют пурин-пиримидиновые блоки, которые могут образовывать левую Z-форму, например, под действием отрицательной суперспирализации природной величины. Появились первые данные о возможной роли Z-формы в процессе кроссинговера эукариот, а также в регуляции генной активности.

§ 4. Состояние воды и гидрофобные взаимодействия в биоструктурах

Современные данные показывают, что вода принимает непосредственное участие в формировании структуры важнейших биополимеров, а также в процессах самосборки сложных надмолекулярных биоструктур.

Особенности строения воды. Как известно, свойства воды обусловлены способностью ее молекул образовывать друг с другом водородные связи между атомами кислорода и водорода $O-H \cdots O$ (см. § 2 гл. VIII). Молекула воды обладает такой электронной структурой, что может образовывать с соседними молекулами воды сразу четыре водородных связи, в которых участвуют

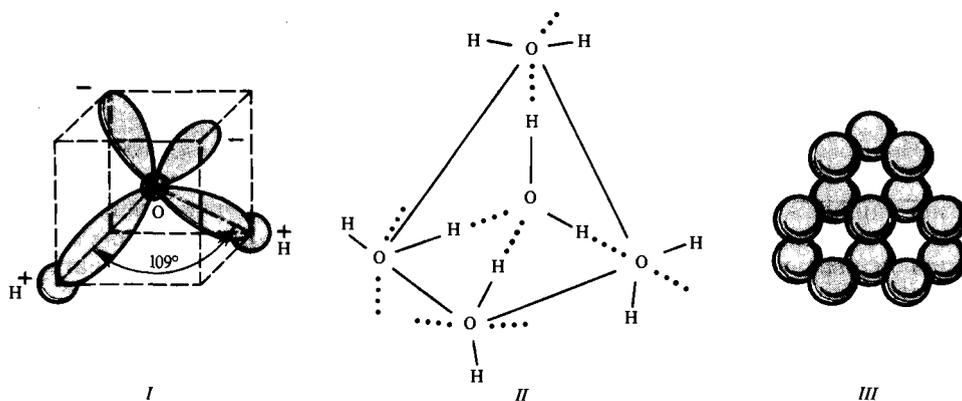


Рис. IX.23.

Строение молекулы воды (I) и ближайшее ее окружение в структуре льда (II, III) (по А. Ф. Скрышевскому, 1971)

по два протона и по две неподеленные пары электронов кислорода от каждой из них (рис. IX.23 и IX.24).

Жидкая вода представляет собой систему с сильно развитыми водородными связями, свойства которой хорошо описываются непрерывной, или континуальной, моделью, где практически все молекулы воды в среднем образуют водородные связи. Однако водородные связи в воде характеризуются широким набором углов и длин. Это означает, что потенциальная энергия водородной связи является непрерывной функцией угла межмолекулярной водородной связи и геометрических характеристик молекул воды. Максимум

функции распределения энергии водородной связи соответствует расстоянию между атомами кислорода $R_{O-O} = 0,286$ нм. В упорядоченной структуре водородные связи линейны и R_{O-O} сокращается до 0,275 нм.

Обычно лед (лед I) обладает тетраэдрической решеткой, где каждый атом кислорода воды расположен в центре тетраэдра, а в вершинах последнего находятся соседние атомы O. Такая ячеистая структура с четырьмя молекулами в каждой ячейке определяет рыхлость и меньшую плотность льда. Такая

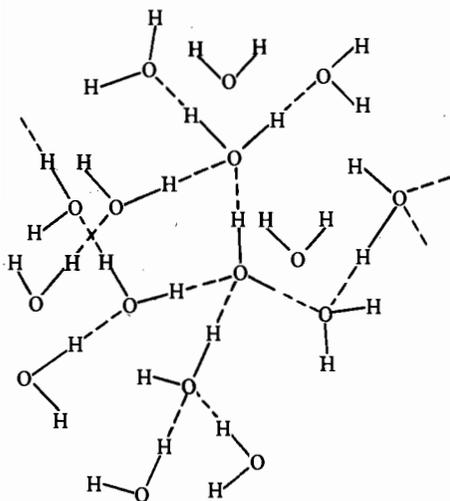


Рис. IX.24.
Структура жидкой воды

же структура, хотя и с большим количеством нарушений, характерна и для жидкой воды. Наличие каркаса из молекул воды, связанных довольно прочно друг с другом четырьмя водородными связями, обуславливает относительно высокую температуру замерзания жидкой воды, высокую теплоту плавления льда, высокую теплоемкость и теплоту парообразования жидкой воды. Д. Айзенберг и В. Каутцман ввели понятия о трех типах состояния жидкой и твердой воды (рис. IX.25). Ясно, что термодинамические параметры характеризуют в основном *D*-структуру. Обсуждается (Г. Шерага) кластерная модель состояния воды, согласно которой вода является смесью мономерных молекул и водородно-связанных кластеров. Кластеры распадаются и вновь образуются, что создает усредненное постоянное окружение для каждой молекулы воды.

Согласно модели Самойлова, мономерные молекулы воды заполняют пустоты ячеистой решетки из водородных связей. При повышении температуры

льда происходит разрушение его упорядоченной структуры, уплотнение молекул с уменьшением удельного объема. Однако одновременно идет и расширение жидкости вследствие увеличения амплитуд межмолекулярных колебаний. В результате взаимодействия разных факторов минимум удельного объема достигается при 4°C. Уменьшение объема в модели Самойлова связано с активационными процессами отрыва молекул воды и заполнением ими полостей решетки.

С термодинамической точки зрения, образование упорядоченной структуры воды вызывает уменьшение энтропии ($\Delta S < 0$), что невыгодно, так как приводит к увеличению полного термодинамического потенциала (свободная энергия) $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ за счет положительного члена $(-T\Delta S) > 0$. Однако это увеличение с избытком компенсируется образованием четырех водородных связей, приводящим к снижению энергии (энтальпия) молекулы воды $\Delta H < 0$. Следовательно, что при этом $|\Delta H| > |T\Delta S|$.

Таким образом, в целом изменение свободной энергии при самопроизвольном образовании упорядоченной структуры воды отрицательно: $\Delta F < 0$. Это и определяет энергетическую выгодность этого процесса $\Delta F \approx \Delta G$ при $\Delta V \approx 0$ (см. (VI.1.10)). Молекулы воды испытывают колебательные движения около положения равновесия с характерным временем колебаний $\tau \sim 10^{-13}$ с. Кроме того, за счет флуктуационных разрывов водородных связей (с энергией активации разрыва ~ 20 кДж/моль при 298 К) может происходить пе-

ремещение отдельных молекул воды в пустоты в соседних ячейках. В жидком состоянии характерное среднее время такой самодиффузии составляет $\tau_D \sim 10^{-10} \div 10^{-11}$ с, а во льду при 0°C оно значительно увеличивается—до $\tau_D \geq 10^{-5}$ с (для сравнения: время валентных колебаний связи O—H $\tau_b \sim 10^{-14}$ с).

Именно за счет эффективной самодиффузии в жидком состоянии, когда молекулы воды занимают не только узлы решетки, но и некоторое число

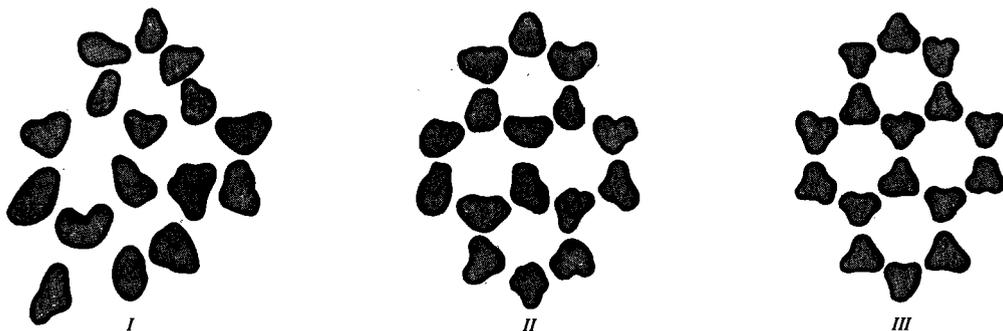


Рис. IX.25.

Мгновенная (I), колебательно усредненная (II) и диффузионно усредненная (III) структуры воды (по М. В. Волькенштейну, 1975)

Молекулы воды осциллируют около своих средних положений с периодом колебаний $\tau_k \sim 2 \cdot 10^{-13}$ с. При временах $t \ll \tau_k$ возникает мгновенная I-структура, где положения молекул не усредняются (I) и могут отличаться от равновесия не более чем на 15%. При временах больших τ_k , но меньших характерных времен τ_n вращательных и трансляционных перемещений ($\tau_n \sim 10^{-5}$ с для льда, $\tau_n \sim 10^{-11}$ с для воды), получается колебательно усредненная K-структура ($\tau_k < t < \tau_n$) (II). При $t \gg \tau_n$ происходит усреднение диффузионных перемещений с образованием D-структуры воды, которая имеет упорядоченный характер (III)

междуузлий, плотность воды превышает плотность льда. Важнейшие физико-химические свойства воды, включая модификации льда, связаны, очевидно, с существованием большого числа переходных структурных элементов, взаимопревращения между которыми еще не вполне ясны.

В формировании структуры биополимеров важную роль играют эффекты изменения структуры самой воды вблизи растворенных веществ или в пограничном слое с другой поверхностью. Взаимодействие воды с полярными группами сводится к гидратации последних, причем энергии гидростатических взаимодействий в сольватной оболочке между водой и ионом могут достигать величин порядка энергии химических связей с увеличением времени «оседлой» жизни воды в несколько раз (для Na^+ в два раза). Однако возможны и такие явления, когда вокруг иона (K^+) молекулы воды из-за сильного притяжения и большой плотности упаковки не образуют равномерного слоя. Это приводит к выталкиванию «лишних» молекул воды наружу и некоторому уменьшению вследствие этого среднего времени жизни в слое (для K^+ на 10%).

Гидрофобные взаимодействия. Наиболее интересны с точки зрения стабилизации структуры макромолекул взаимодействия воды с гидрофобными соединениями. Изучение растворимости неполярных углеводов при переносе их из неполярных растворителей в воду показало, что процесс растворения этих соединений в воде носит экзотермический характер. Он идет с повышением температуры и выделением тепловой энергии, что свидетельствует о понижении энтальпии системы при смешивании углеводов с водой ($\Delta H < 0$).

Однако это понижение энтальпии компенсируется уменьшением энтропии ($\Delta S < 0$) и, как следствие этого, возрастанием полного термодинамического потенциала ($\Delta G > 0$). В целом уменьшение энтальпии ($\Delta H < 0$) по абсолютной величине меньше, чем уменьшение энтропии, и, следовательно, растворение в воде неполярных соединений термодинамически невыгодный процесс:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S > 0.$$

Так, при переносе из бензола и растворении этана в воде при 298 К энтропия понижается на $\Delta S = -84$ Дж/(моль·К), а энтальпия—на $\Delta H = -9240$ Дж/моль. Общее возрастание термодинамического потенциала системы этан—вода по сравнению с системой этан—бензол составляет

$$\begin{aligned} \Delta G &= \Delta H - T\Delta S = -9240 + 298 \cdot 84 \approx \\ &\approx 25\,500 - 9240 \approx 16\,000 \text{ Дж/моль} = 16 \text{ кДж/моль}. \end{aligned}$$

Следствием этого является отталкивание водой молекул неполярных веществ, которым термодинамически выгоднее взаимодействовать друг с другом, чем с водой. Эффект отталкивания растворителя и представляет собой так называемые гидрофобные взаимодействия, которые, как видно, не связаны с существованием каких-либо особых сил взаимного притяжения между элементами системы, а имеют чисто термодинамическую причину.

Молекулярная картина, отражающая изменение структуры воды и взаимную ориентацию молекул растворенного вещества и растворителя, достаточно сложна. Так, в данном случае в отличие от процесса образования ассоциатов молекул в чистой воде уменьшение энтропии не компенсируется снижением энтальпии системы.

Прежде всего возникает вопрос о том, какие конкретные изменения в системе углеводород—вода приводят к уменьшению ее энтропии. Очевидно, растворение углеводорода в воде связано с внедрением его молекул в структурированные области воды и их разрушением. Небольшие молекулы, способные встраиваться в льдоподобный каркас водных кластеров, лучше растворяются, поскольку они относительно мало разрушают водородные связи. Однако, как правило, достаточно большие молекулы гидрофобных соединений разрушают водородные связи в воде. Так как энергия возникающих ван-дер-ваальсовых взаимодействий между молекулами растворенного вещества и водой меньше энергии разрушенных водородных связей чистого растворителя, то в целом это должно было бы привести к увеличению энергии системы. Следовательно, данное обстоятельство и является причиной разделения системы на две фазы молекулы чистого растворителя и гидрофобного соединения. Вместе с тем общее уменьшение энтропии системы углеводород—вода при растворении неполярных веществ в воде интерпретируется как образование «льдоподобной оболочки» вокруг неполярной молекулы или «структурирования воды неэлектролитами».

Эти понятия неточно отражают природу явления, поскольку в действительности никаких «айсбергов», структурно подобных льду, вокруг неполярных молекул не образуется. При помещении молекул неэлектролита в воду молекулы последней вынуждены ориентироваться на его поверхности для обеспечения максимального числа водородных связей в условиях нарушенной регулярной ячеистой структуры и исчезновения свободных пустот в пограничной области. Это приводит к уплотнению молекул воды, прилежащих к гидрофобной поверхности, увеличивает среднее время «оседлой» жизни до $\tau \sim 10^{-7}$ с и ведет к уменьшению энтропии.

Уплотненный упорядоченный каркас из молекул воды образуется вокруг каждой растворенной в воде молекулы гидрофобного соединения. Образование уплотненного слоя находит свое отражение, в частности, в сдвиге инфракрас-

ных полос поглощения воды (5180 и 2130 см^{-1}), свидетельствующих об упрочении водородных связей между молекулами воды. Дальнейшее повышение концентрации неэлектролита в воде приводит уже к гидрофобным ван-дер-ваальсовым взаимодействиям между самими растворенными молекулами и образованию их ассоциатов с уплотненным упорядоченным слоем воды на гидрофобной поверхности. Наряду с уменьшением подвижности молекул воды вклад в понижение энтропии системы дает ограничение подвижности углеводородных цепей растворенных молекул неэлектролитов.

Стабилизация биоструктур. Гидрофобные взаимодействия играют существенную роль в формировании биоструктур, представляя собой один из основных факторов их стабилизации. В самом деле, эффект взаимодействия полярных групп белка с полярными молекулами воды связан с преобладанием полярных аминокислотных остатков на поверхности белковой глобулы. Однако наряду с этим возможно и взаимодействие посредством водородных связей полярных пептидных связей ($\text{NH}\cdots\text{OC}$), принадлежащих разным участкам цепи внутри глобулы. Так как энергия водородных связей между пептидными связями в белке и между ними и водой примерно одинакова, это должно было бы приводить к рыхлой структуре макромолекулы в водном растворе. Однако реально существующая структура упорядочена и компактна и, как можно заключить, в основном определяется именно гидрофобными взаимодействиями. Отдельные аминокислотные остатки различаются по своим гидрофобным свойствам и могут вести себя как полярные или неполярные соединения. Термодинамическую оценку степени гидрофобности делают по величине изменения ΔG , приходящегося на боковую группу аминокислоты при ее переносе из этанола в воду (К. Танфорд).

Так, к гидрофобным аминокислотам относятся такие, как *три* ($\Delta G = +12570$ Дж/моль), *иле* ($+12440$), *фен* ($+11100$), *гис* ($+5900$), *мет* ($+5500$), а гидрофильные представлены *ала* ($+3000$), *глу* ($+2300$), *сер* ($+170$), *гли* (0), *асн* (-40), *гли* (-420). Распределение полярных и неполярных свойств не всегда совпадает с гидрофобностью аминокислот, которые могут проявлять те или иные свойства в зависимости от своего положения и окружения в белке. Взаимодействие неполярных групп с водой приводит к их преимущественному «заталкиванию» внутрь белковой глобулы и соответственно выходу наружу полярных групп. В предельном случае общая топографическая модель белковой глобулы предполагает существование ядра глобулы, заполненного гидрофобными аминокислотами и защищенного слоем обращенных в воду полярных групп. На основании этих представлений Фишер приближенно оценил форму глобулы, разбив все аминокислоты на две группы: полярные и гидрофильные (*арг*, *асп*, *гис*, *глу*, *лиз*, *сер*, *тир*, *тре*) и гидрофобные (остальные 12). Если все остатки занимают примерно одинаковые объемы, то в этом случае отношение b_s числа гидрофильных остатков к гидрофобным равно

$$b_s = \frac{r^3}{(r-d)^3} - 1,$$

где r —радиус глобулы; d —толщина внешнего гидрофильного слоя, равная $\sim 0,4$ нм.

Когда число гидрофильных остатков достаточно для покрытия всей глобулы, последняя принимает сферическую форму ($b = b_s$).

В реальных условиях, однако, наблюдаются отклонения величины b , измеренной экспериментально, от теоретических значений b_s для сферической глобулы. При $b > b_s$ число гидрофобных остатков превышает минимальное их число, необходимое для защиты от воды внутреннего гидрофобного ядра, и глобула становится эллипсоидальной. Наоборот, при $b < b_s$ незащищенные

гидрофобные участки на поверхности глобул приводят к их слипанию. Эта картина, конечно, дает лишь грубое представление о реальной действительности.

Детальные расчеты (Д. Ф. Брандтс), выполненные с учетом статистического характера распределения гидрофобных, гидрофильных и нейтральных групп в пределах макромолекулы и значений свободной энергии переноса группы на поверхность или внутрь глобулы, показали, что около 10—25% гидрофобных групп может располагаться на поверхности глобулы. Эксперименты выявили, что в ряде случаев число неполярных групп на поверхности даже превышает число их внутри белка (в молекуле лизоцима их числа соответственно 32 и 16). Очевидно, гидрофобные силы имеют решающее значение в определении общего характера топографии белковой глобулы, но истинная картина взаимодействий в пределах макромолекулы значительно сложнее.

Оценивая роль различных взаимодействий в стабилизации глобулярных белков, следует считать, что характер нативной конформации определяется не каким-либо одним эффектом, а представляет собой результат совместного тонко сбалансированного действия целого ряда энергетических и энтропийных факторов. Водородные связи, образованные между полярными группами и водой и внутри глобулы,—главный фактор в обеспечении стабильности отдельных областей молекулы белка. Они ограничивают локальные конформационные изменения внутри белка, определяя жесткость конструкции и общий характер потенциальных барьеров для внутренних движений частей нативной структуры. В то же время гидрофобные взаимодействия между боковыми группами на отдельных участках основной цепи играют решающую роль в процессах сворачивания глобулы из первичной аминокислотной последовательности и в определении ее общей формы. В обоих случаях вода как растворитель имеет огромное значение, облегчая полярные взаимодействия за счет образования водородных связей как на поверхности, так и внутри макромолекулы белка.

Неоднородность распределения молекул воды. Гетерогенность организации макромолекулярной структуры влияет на распределение молекул воды. Очевидно, вода может существовать в виде объемной фазы свободного растворителя и связанной воды, состояние которой зависит от природы и мест локализации белковых групп, с которыми она взаимодействует.

Каковы данные по состоянию воды в гидратной оболочке белка? Основной вклад в энергию гидратации дают водородные связи между водой и полярными группами молекулы белка. Для образования гидратной оболочки глобулярных белков имеет значение пространственная доступность протон-донорных и протон-акцепторных центров для взаимодействия с молекулами воды. Оказалось, что гетероатомы нерегулярно расположены на поверхности глобулы, которая не может служить матрицей для кристаллизации воды. Так как число и размеры гидрофобных участков на поверхности также невелики, то «шуба» из уплотненных молекул воды вокруг глобулы не образуется. Количество гидратационной воды, определенное различными методами, составляет 0,3—0,4 г H_2O /г сухого белка, а общее содержание воды в кристаллах глобулярных белков не превышает, как правило, 0,45—0,60 г H_2O /г сухого белка. Следовательно, количество свободной воды в белке невелико. Она, в частности, может заполнять внутренние «полости», свободные от белкового вещества, содержание воды в этих полостях также невелико (в лизоциме—2, трипсине—12 молекул). Она может обмениваться с поверхностными водными слоями вследствие флуктуационных «открытий» внутренних полостей.

Реальная поверхность белковой глобулы составляет несколько сотен квадратных нанометров. Так, для инсулина $S=34$ нм², лизоцима—65 нм². Количество связанной воды может хватать для покрытия не более 60—

70% поверхности белковой глобулы и явно недостаточно для образования на поверхности глобулы сплошного монослоя воды.

Измерение изотерм сорбции и десорбции воды позволило оценить число молекул воды в более прочно удерживаемом первом слое на поверхности белка. Оно составляет от нескольких десятков (лизозим 45—64) до сотен (α -химотрипсин 72—103) молекул. Основными центрами первичной гидратации белка являются гетероатомы боковых полярных групп аминокислот и пептидные группы. Амидные группы и ионные пары не принимают такого активного участия в удержании гидратационной воды и представляют собой более «слабые» центры связывания. Среднее число молекул воды составляет в среднем четыре на один центр.

Общая картина гидратации поверхности белка приведена на рис. IX. 26. Отдельные центры окружены молекулами воды, которые образуют, кроме того, и водные мостики между гидратационными областями, принадлежащими отдельным центрам. В результате образуется сплошная гидратационная «кружевоподобная» оболочка, соединяющая отдельные полярные группы. Гидратная оболочка на поверхности глобулы является системой молекул воды, гидратирующих локальные центры гидратации (Ю. И. Хургин). Время жизни слабосвязанных молекул воды в такой гидратной оболочке невелико ($\tau \sim 10^{-11} \div 10^{-10}$ с), но около центра оно намного больше ($\tau \sim 10^{-6}$ с).

Молекулы воды в первичном прочном слое образуют друг с другом в среднем не менее двух-трех водородных связей. В целом

около поверхности белка может удерживаться до двух-трех слоев воды, многослойной «шубы» кристаллизационной воды при этом не образуется. При сорбции воды отдельные гидрофобные участки на поверхности «заполняются» водой лишь после ее энергетически более выгодного связывания с соседними полярными группами. Прочно связанная вода составляет около 10% от массы биополимеров и характеризуется большими временами жизни $10^{-3}—10^{-7}$ с.

Для понимания свойств прочносвязанной воды необходимо учесть, что ее фракция неоднородна в отношении участков и групп биополимера, с которыми взаимодействуют молекулы воды. Вода связывается прежде всего на граничащей с ней поверхности биополимера. Следовательно, движение прочно связывающих ее соответствующих боковых групп должно определять и времена

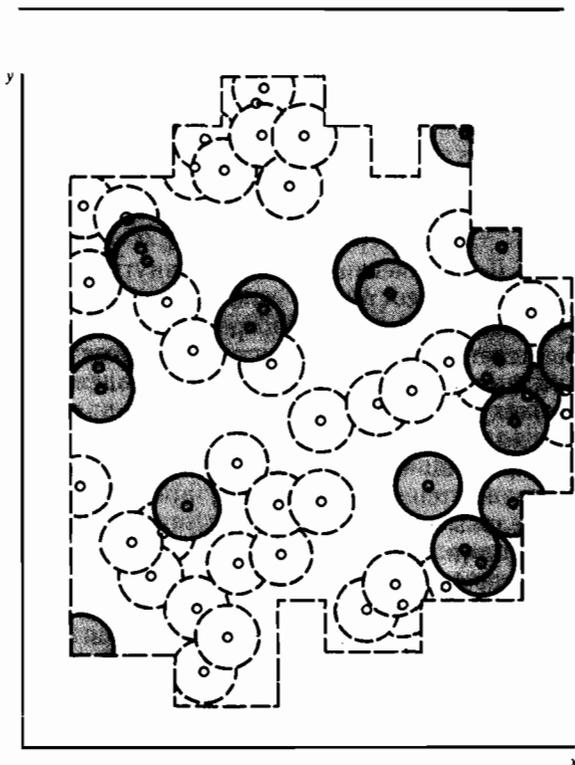


Рис. IX.26.

Карта гидратации поверхности молекулы α -химотрипсина (по Ю. И. Хургину, 1980)

Сплошными линиями обозначена область локализации молекул воды, связанных гетероатомами поверхностных боковых полярных групп; пунктирными окружностями — область локализации молекул воды на пептидных группах

жизни этой фракции молекул связанной воды. Это будет, конечно, справедливо, если время жизни молекул воды в связанном состоянии заметно больше времени, определяемого движением биополимера в целом или его отдельных участков, что в общем выполняется для прочносвязанной воды ($\tau \sim 10^{-3} \div 10^{-7}$ с). Кроме того, время жизни молекул воды в растворе ($\tau \sim 10^{-11}$ с) биополимеров может увеличиваться за счет обмена с водой, прочно связанной в подповерхностных медленно движущихся ($\tau \sim 10^{-5}$ с) слоях белка. Очевидно, на время жизни воды будут влиять и изменения подвижности макромолекул, например при изменении температуры, образовании межмолекулярных связей и т. д.

Таким образом, физико-химическая природа связанной воды во многом обусловлена ее взаимодействиями с малоподвижными структурами. Этим определяется существование в растворах биополимеров нескольких фракций связанной воды, времена жизни которой занимают промежуточное положение между значениями, характерными для свободной (10^{-11} с) и сильносвязанной воды ($10^{-3} - 10^{-5}$ с) (С. И. Аксенов).

Динамические свойства внутриклеточной воды в значительной степени отражают состояние клеточных структур. Существует также ряд данных, указывающих на непосредственное участие небольших количеств воды в изменении конформации глобулярных белков. В следующей главе будут описаны подробно характеристики и модели динамической подвижности биомолекул. Сейчас лишь необходимо отметить, что функционирование белков тесно связано не только с характером их конформаций, но, главное, с их конформационной подвижностью, зависящей от присутствия воды. Так, при низкой степени гидратации препаратов α -химотрипсина возникающие дополнительные контакты между поверхностными дегидратированными полярными группами приводят к увеличению жесткости глобулы α -химотрипсина и потере им ферментативной активности в диметилсульфоксиде. В сильно высушенных препаратах, вплоть до некоторого критического значения гидратации, вообще не наблюдается никакой активности. Восстановление последней при увеличении степени гидратации образца происходит резко в узком диапазоне увеличения числа молекул H_2O от 170 до 180 на одну молекулу белка. Очевидно, в этой области происходит растормаживание определенных степеней свободы, функционально важных для ферментативного акта. Существенно, что необходимое для этого процесса количество воды намного меньше, чем было бы нужно для завершения образования гидратной оболочки (Ю. И. Хургин).

Появление некоторых изменений в структуре фибриллярных и глобулярных белков, полипептидов при их гидратации отмечалось и по результатам ИК-спектроскопии. Наряду с данными о наличии внутри белковых глобул отдельных молекул воды это свидетельствует о неотъемлемой роли воды в формировании молекулы белка. Очевидно, внедрение некоторого количества воды в качестве структурного элемента в белковую глобулу может облегчить необходимое для обеспечения функциональной активности изменение ее конформации за счет эффекта «разрыхления» и «смазки». Таким образом, роль воды в формировании биоструктур связана, с одной стороны, со стабилизирующими гидрофобными взаимодействиями, а с другой—состоит в облегчении конформационной подвижности макромолекул.

Энергетические эффекты гидратации. Анализ эффектов гидратации при расчетах конформационной энергии на примере метиламидов N-ацетил-аминокислотных остатков (Г. Шерага) показал, что конформационная энергия белковой глобулы может не зависеть существенно от присутствия воды. Гидратация включает специфические взаимодействия воды с полярными атомами белковых групп за счет образования с ними водородных связей и

неспецифические взаимодействия, представляющие собой попарные ван-дер-ваальсовы взаимодействия между всеми атомами воды в гидратационной оболочке и атомами белковой группы (см. § 1, 2, гл. VIII). Преимущественные места гидратации (метиламидов аминокислот) представляют собой, как правило, амидные, гидроксильные и карбонильные группы. Водородные связи образуются между водой и кислородом карбонильной группы и атомами пептидной связи.

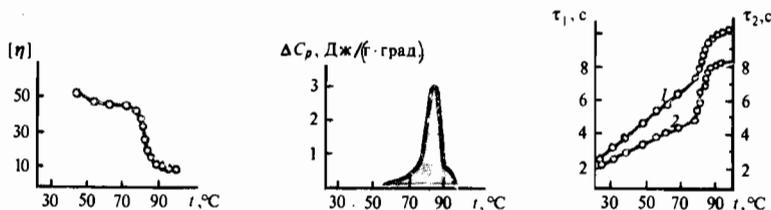


Рис. IX.27.

Изменение вязкости (η), теплоемкости (ΔC_p) и времени спин-решеточной (τ_1) и спин-спиновой (τ_2) релаксаций в растворе ДНК тимуса телянка (по Г. М. Мревришвили, 1981)

Подробные вычисления и построенные на их основе энергетические карты (см. § 1 гл. IX; рис. IX.9 и IX.10) показали, что при гидратации существуют области значений углов φ , ψ , где происходит стабилизация и дестабилизация с соответствующими изменениями глубин энергетических минимумов. Стабилизация в области изменения углов φ (-40° , -100°), ψ (0 , -80°) достигается за счет снятия при гидратации энергетически невыгодных электростатических взаимодействий между диполями пептидной группы. Образование водородных связей с водой при гидратации ослабляет выгодные электростатические и ван-дер-ваальсовы взаимодействия между расположенными друг против друга CO- и NH- группами. Это ведет к дестабилизации структуры в областях изменения φ (-40° , -100°), ψ (50° , 110°). Для аланина значения пары углов φ , ψ , соответствующих области минимума энергии, где наблюдается дестабилизация, составляют -86° , 82° .

Таким образом, влияние воды на конформационную энергию пептидов существенно не изменяет мест локализации энергетических минимумов на конформационной карте. Однако при этом может сильно изменяться относительная стабильность отдельных минимумов конформационных участков, что создает, в свою очередь, предпосылки для характерных изменений конформации белка в различных функциональных процессах.

Кооперативный характер системы биополимер—вода ярко проявляется в процессах внутримолекулярного плавления биологических макромолекул. Температурные зависимости изменения теплоемкости, времен подвижности протонов и вязкости растворов биополимеров характеризуются одновременным и резким изменением этих параметров в одном и том же температурном диапазоне (рис. IX.27). Небольшие изменения в количестве и состоянии относительно небольшой фракции молекул воды, образующих гидратный слой макромолекулы, приводят к резким изменениям термодинамических и релаксационных параметров всего раствора в целом. Быстрый обмен между протонами молекул воды вовлекает все фракции воды, включая молекулы, находящиеся во внутренних слоях белка. Все это делает систему биополимер—вода единой кооперативной системой, в которой любые изменения в состоянии как растворителя, так и макромолекулы носят взаимосвязанный и взаимообусловленный характер.

§ 5. Динамика фазовых переходов в макромолекулах

Регулярный характер конформации биополимеров зависит от характера объемных взаимодействий, которые изменяются при разных внешних условиях (температура, pH, ионная сила раствора). Это соответственно нарушает регулярность в строении макромолекулы и способствует превращению ее структуры в статистический клубок. Так, изменение pH раствора синтетического полипептида поли- γ -бензил-L-глутамата (ПБГ) и полиглутаминовой кислоты (ПГК) приводит к потере α -спиральности (рис. IX.28), что характеризуется

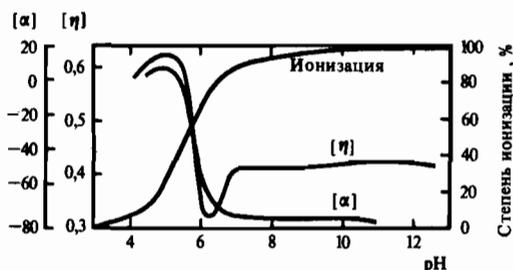


Рис. IX.28. Зависимость степени ионизации, характеристической вязкости ($[\eta]$) и удельной вращательной способности ($[\alpha]$) от pH среды в области перехода спираль—клубок (по М. В. Волькенштейну, 1975)

изменением значений характеристической вязкости $[\eta]$, удельной вращающей способности $[\alpha]$, степени ионизации. Видно, что при pH=6 происходит резкий переход спираль—клубок, связанный с исчезновением упорядоченной структуры. Сходные результаты были получены для полилизина, сополимеров лизина и глутаминовой кислоты.

Наблюдаемые изменения происходят в отдельной молекуле, а не в кристалле и по своему резкому S-образному характеру свидетельствуют о кооперативном характере перехода. Это внутри-

молекулярное плавление, аналогичное внешне фазовому переходу. Физическая основа переходов спираль — клубок состоит в том, что состояние макромолекулы, у которой все мономерные звенья участвуют в образовании водородных связей, более выгодно энергетически, а состояние свободной макромолекулы более выгодно энтропийно из-за ее гибкости. Поэтому энергии этих двух состояний по-разному меняются при изменении температуры, состава растворителя, pH. Температура перехода соответствует равенству энергий двух состояний.

Кооперативный характер перехода. Изменение энергии молекулы при образовании водородной связи одним из звеньев существенно зависит от наличия или отсутствия водородных связей у соседних с ним звеньев. Эта кооперативность носит энтропийный характер.

Рассмотрим причины кооперативного характера превращения, исходя из того, что плавление приводит к разрушению упорядоченной вторичной структуры и разрыву водородных связей между звеньями полимера. Если разность энергий состояний спираль—клубок $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ известна как функция температуры, то доля спирализованных звеньев (θ) может быть найдена по формуле

$$\theta = \frac{e^{\Delta G/(RT)}}{1 + e^{\Delta G/(RT)}}, \quad (\text{IX.5.1})$$

а соответственно доля расплавленного материала составит

$$1 - \theta = \frac{1}{1 + e^{\Delta G/(RT)}}. \quad (\text{IX.5.2})$$

Резкость перехода при нагревании можно вычислить, дифференцируя выражение (IX.5.2) по T и учитывая, что при $T = T_{пл}$, $\Delta G = 0$

$$\left| \frac{d\theta}{dT} \right| \tau_{из} = \left| \frac{\Delta H}{4RT_{из}^2} \right| \quad (\text{IX.5.3})$$

где H —энтальпия перехода спираль—клубок. Величина ΔH должна зависеть от числа n освобожденных звеньев, т. е. $\Delta H \simeq n\Delta H_0$, где ΔH_0 —энтальпия разрыва связей одного звена. Кооперативный характер процесса плавления означает, что в области перехода одновременно меняется состояние n звеньев цепи, а резкость перехода пропорциональна n .

Количественная теория кооперативных переходов спираль—клубок. Эта теория должна давать выражения для зависимости числа разорванных водо-

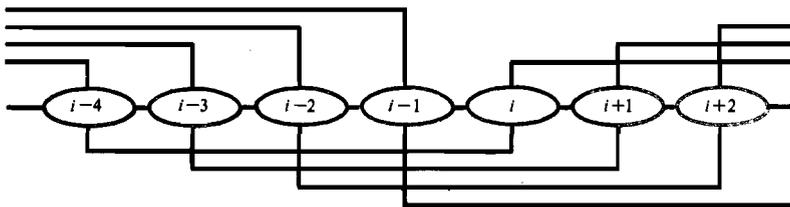


Рис. IX.29.

Модель α -спирали как одномерного гомополимера (объяснение см. в тексте) (по М. В. Волькенштейну, 1965)

родных связей от температуры. В α -спирали каждое звено соединено водородными связями с двумя другими, отстоящими от него на четыре звена в цепи (рис. IX. 29). Для освобождения данного звена надо одновременно разорвать не две, а сразу несколько водородных связей. Теория переходов спираль—клубок основана на одномерной модели кооперативных явлений. Энергия всей цепи зависит от набора свободных и связанных звеньев, поскольку их энергии отличаются друг от друга. Для нахождения условий перехода спираль—клубок необходимо вычислить статистическую сумму цепи, учитывая всевозможные распределения водородных связей между звеньями (см. § 3 гл. VIII). Статистическая сумма цепи равна

$$\bar{z} = \sum_{\{\mu_i\}} e^{-G\{\mu_i\}/(RT)} \quad (\text{IX.5.4})$$

где G —собственная энергия i -го звена, включающая и энергию его водородных связей. μ_i принимает значение, равное нулю для каждого звена в свободном состоянии и равное единице в связанном состоянии. Подробные расчеты (Б. Г. Зимм, Дж. К. Брегг) показывают, что в произведении (IX. 5.4) наибольшее значение имеют два типа множителей, которые определяют энергию состояния звена, следующего за связанным или за свободным звеньями.

Множитель для каждого звена в связанном состоянии ($\mu_i = 1$) равен

$$S = e^{-\Delta G/(RT)} = e^{-(\Delta H - T\Delta S)/(RT)} \quad (\text{IX.5.5})$$

Выражение (IX. 5.5) имеет смысл константы равновесия для образования водородной связи в звене, следующем за связанными звеньями, т. е. константы равновесия процесса увеличения серии связанных звеньев на одно звено за счет соседнего участка свободных звеньев. Величина ΔH определяет суммарное изменение энергии связей при фиксации звена, а ΔS включает уменьшение энтропии при ограничении его подвижности. Величина S определяет, очевидно,

долю спирализованных звеньев в цепи. Другой множитель в (IX.5.4) для каждого звена в связанном состоянии ($\mu_i=1$), следующего за тремя (и более) свободными звеньями ($\mu_{i-1}=\mu_{i-2}=\mu_{i-3}=0$), равен

$$\sigma = e^{-G_{\text{иниц}}/(RT)}$$

где $G_{\text{иниц}}$ —энергия иницирования спирального участка. Эта энергия затрачивается для закрепления сразу четырех звеньев, что необходимо для фиксации одного звена, следующего за тремя свободными. Фактически в этом случае при фиксации одного звена организуется сразу целый спиральный участок с понижением энтропии, что и является следствием кооперативности системы.

Если принять, что при вращении свободного звена около каждой связи возможны три поворотных изомера, то снижение энтропии при фиксации одного звена

$$G_{\text{иниц}} \simeq G_f(0,0,0,1) = -RT\Delta S = -RT\ln(1/3),$$

а при образовании спирального участка из четырех звеньев

$$G_{\text{иниц}} \simeq -4RT\ln(1/3) \simeq 10,5 \text{ кДж/моль.}$$

Отсюда следует, что множитель σ

$$\sigma = e^{\Delta S} \simeq 10^{-2}. \quad (\text{IX.5.6})$$

Степень кооперативности процесса тем больше, чем меньше множитель σ , зависящий от понижения энтропии при фиксации одного звена. При $\sigma=1$ кооперативность отсутствует ($G_{\text{иниц}}=0$). Статистическая сумма в (IX.5.4), найденная матричными методами (ср. (VIII.3.10 и VIII.3.11)), оказывается равной

$$Z = (1+S)^N, \quad (\text{IX.5.7})$$

где N —число звеньев в цепи.

Доля звеньев, связанных водородными связями,

$$\theta = \frac{1}{N} \frac{\partial \ln Z}{\partial \ln S} = \frac{S}{1+S} \quad (\text{IX.5.8})$$

плавно зависит от температуры и не дает резкого перехода.

При $\sigma=0$ (полная кооперативность, $G_{\text{иниц}} \rightarrow \infty$)

$$Z = 1 + S^N,$$

а доля связанных звеньев

$$\theta = \frac{1}{N} \frac{\partial \ln Z}{\partial \ln S} = \frac{S^N}{1+S^N}. \quad (\text{IX.5.9})$$

В этом случае цепь может находиться только в двух состояниях: полная спиральность ($S > 1$) и клубок ($S < 1$). При $S > 1$ $S^N \gg 1$, т. е. цепь является полностью спиралью, а при $S < 1$ $S^N \ll 1$, $Z_{\text{клуб}} = 1$, т. е. цепь переходит в состояние клубка. Таким образом, при $S=1$ происходит резкий кооперативный переход спираль—клубок (рис. IX.30). Этот результат следует и из условия $\sigma = e^{-G_{\text{иниц}}/(RT)} = 0$, так как при бесконечно большой энергии иницирования спирального участка в цепи невозможно сосуществование в одной молекуле спиральных и клубкообразных областей. Естественно, что при конечных, но малых значениях σ переход осуществляется в некоторой области изменения S около точки $S=1$. Это означает, что в реальных системах имеется некоторый небольшой, но конечный интервал изменения температуры, ширина которого определяет область сосуществования спиральных и клубкообразных участков цепи.

Изменения ΔH и ΔS в процессе перехода сильно зависят от взаимодействия мономерных звеньев с растворителем, молекулы которого могут

конкурировать с группами цепи за водородные связи. Так, в ряде случаев увеличение энтропии самой макромолекулы при переходе спираль—клубок компенсируется уменьшением энтропии при образовании водородных связей полимер—растворитель и перестройкой структуры самого растворителя (см. § 4 этой главы). Поэтому приведенные выше параметры переходов спираль—клубок следует интерпретировать с учетом изменения состояния растворителя.

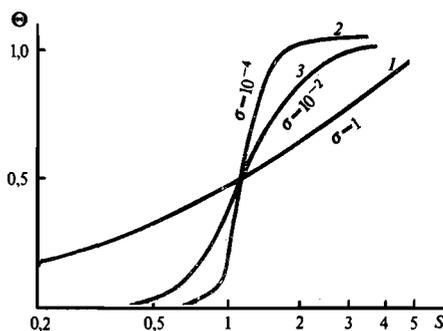


Рис. IX.30.
Переход спираль—клубок (по М. В. Волькенштейну, 1965):
1—некооперативный, 2, 3—кооперативный

Роль выделенных степеней свободы в фазовых переходах. До сих пор в спиральном и клубкообразном состояниях не рассматривались какие-либо определенные степени свободы, по которым совершаются фазовые переходы. Разрыв и образование связей таким образом могли происходить в любой области макромолекулы при переходе спираль—клубок.

В следующих главах (X, XI) будет подробно рассмотрены конформационные превращения биологических полимеров, сопровождающие их функционирование; они совершаются по выделенным степеням свободы и в основном носят не статистический, а детерминистический характер. Особенность фазовых переходов в макромолекулярных системах также связана с тем, что они происходят в гетерогенных молекулярных конструкциях, где заранее запрограммировано расположение жестких (α -спирали в белке) и мягких участков, типичное для данного класса белковых макромолекул. Свойства фазовых (конформационных) переходов в макромолекулах были рассмотрены в работах Д. С. Чернавского. В силу гетерогенности конструкции разные вклады в свободную энергию концентрируются в разных местах макромолекулы в зависимости от вида энергии. Так, энергия электростатического взаимодействия концентрируется вблизи заряженных групп, а энтропийная часть свободной энергии — в размыкающихся и замыкающихся связях-фиксаторах, роль которых выполняют водородные связи. В отличие от этого в термодинамически равновесных однородных системах все части свободной энергии распределены по телу равномерно. Значение теплоты перехода ($\Delta Q \sim 42$ кДж/моль) в пересчете на одну молекулу сопоставимо с обычными значениями теплоты переходов первого рода (см. § 2 гл. VII). Однако в расчете на единицу массы или на моль углерода величина $\Delta Q \sim 4,2 \cdot 10^{-3}$ кДж/г, т. е. в десятки тысяч раз меньше. Столь же малыми оказываются удельные изменения энтропии и теплоемкости. По сравнению с общим числом межатомных связей в макромолекуле число разрываемых связей n очень мало. Это означает, что разрыв всего лишь тысячной доли имеющихся связей приводит уже к фазовому (конформационному) переходу в макромолекуле. Именно это характерно не для равновесных тел, а для конструкций, где изменение небольшого числа связей-

фиксаторов влечет перестройку системы в целом. Тепловые эффекты, сопровождающие эти перестройки, весьма малы (см. § 2, гл. VII).

Рассмотрим фазовый переход при изменении температуры в макромолекуле, где он сопровождается разрывом определенной связи по выделенной степени свободы (рис. IX.31). Необходимо учитывать изменение энтропии как выделенной степени свободы, так и других микроскопических степеней свободы.

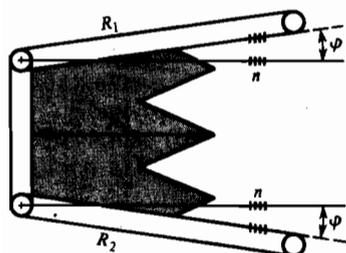


Рис. IX.31.

Эквивалентная механическая схема сегментальных движений макромолекул:

r — резервуар энергии; R_1, R_2 — рычаги (порядка размеров макромолекул ~ 200 нм); n — водородные связи, выполняющие роль фиксаторов; φ — углы вращения

Возможны два состояния: 1) пружина напряжена и фиксирующие связи замкнуты—это конструкция типа фермы (f); 2) пружина расслаблена и фиксаторы разомкнуты—это машина (m). При подсчете свободных энергий надо принимать во внимание, что группы, участвующие в фиксирующих связях, обладают различной энтропией в состояниях m и f .

Свободные энергии состояний равны

$$G_m = \bar{G}_m - TS_m^0 - T \sum_i^n S_m^i;$$

$$G_f = \bar{G}_f - TS_f^0 - T \sum_i^n S_f^i + E_{\text{упр}} - \sum_i^n \epsilon_i. \quad (\text{IX.5.10})$$

Здесь специально выделены энергии упругих деформаций $E_{\text{упр}}$, энтропии выделенной степени свободы S_m^0, S_f^0 , а также энергии ϵ_i и энтропии S_m^i, S_f^i связей фиксаторов. Величины G_m и G_f —свободные энергии, обусловленные взаимодействием с растворителем (водой).

Разность свободных энергий равна

$$\Delta G = G_m - G_f = \Delta \bar{G} - T \Delta S - T \Delta S^0 - E_{\text{упр}} + n \bar{\epsilon}, \quad (\text{IX.5.11})$$

где ΔS и $\bar{\epsilon}$ —усредненные значения;

$$\bar{\epsilon} = n^{-1} \sum_i^n \epsilon_i; \quad \Delta \bar{S} = n^{-1} \sum_i^n (S_m^i - S_f^i).$$

По порядку величины $\bar{\epsilon} \sim 8 \div 12$ кДж/моль можно оценить разность энтропий, учитывая, что при переходе изменяются углы вращения φ^m и φ^f групп-фиксаторов. Если величины $\varphi^m = \pi, \varphi^f \simeq 0,5$, то величина ΔS равна

$$\Delta S \simeq k_B \ln(\varphi^m / \varphi^f) \simeq (1 \div 2) k_B.$$

В том случае, когда величина ΔG зависит от взаимодействия с водой, ее можно оценить по числу центров связывания молекул воды. Например, в рассматриваемой модели связи, расположенные в полости, могут фиксировать воду в состоянии m (полость открыта), но не в состоянии f . Таким образом, при переходе $m \rightarrow f$ вода вытесняется из полости и переходит на поверхность глобулы.

Вклад воды в энтальпийную и энтропийную части изменения $\Delta \bar{G}$ равен

$$\Delta H_{\text{H}_2\text{O}} = -n_1 \Delta \bar{\epsilon}_{\text{H}_2\text{O}}(N); \Delta S_{\text{H}_2\text{O}} = n_1 \Delta \bar{S}_{\text{H}_2\text{O}}(N), \quad (\text{IX.5.12})$$

где $\Delta \bar{\epsilon}(N)$ и $\Delta \bar{S}(N)$ —усредненные по n_1 центрам связывания значения энтальпии и энтропии N молекулы воды.

Тогда полное изменение ΔG в (IX.5.11) запишется в данном случае как

$$\Delta G = -n_1 \Delta \bar{\epsilon}_{\text{H}_2\text{O}}(N) - T n_1 \Delta \bar{S}_{\text{H}_2\text{O}}(N) - T n \Delta S - T \Delta S^0 - E_{\text{упр}} + n \bar{\epsilon}. \quad (\text{IX. 5.13})$$

Температура перехода $m \rightleftharpoons f$ определится из условия $\Delta G = \Delta H - T_{\text{пер}} \Delta S = 0$, т. е.

$$T_{\text{пер}} = \Delta H / \Delta S, \quad (\text{IX.5.14})$$

а теплота перехода

$$\Delta Q = T_{\text{пер}} \Delta S = T_{\text{пер}} [n \Delta \bar{S} - n_1 \Delta \bar{S}_{\text{H}_2\text{O}}(N) + \Delta S^0]. \quad (\text{IX.5.15})$$

«Полуширину» перехода $\Delta T_{\text{пер}}$ находят из условия $|\Delta F| \simeq k_B T$. Отсюда

$$\Delta T_{\text{пер}} = \frac{k_B T_{\text{пер}}}{n \Delta \bar{S} + \Delta S^0 - n_1 \Delta \bar{S}_{\text{H}_2\text{O}}(N)}, \quad (\text{IX.5.16})$$

где ΔH , $n \Delta \bar{S} + \Delta S^0 - n_1 \Delta \bar{S}_{\text{H}_2\text{O}}(N)$ следует рассматривать как параметры, подлежащие определению по формулам (IX. 5.14) и (IX.5.15), если известна экспериментальная кривая перехода $m \rightleftharpoons f$. Используя затем выражения (IX.5.11) и (IX.5.12), можно оценить n и n_1 —число групп, участвующих в фиксации состояния f . В обычных условиях величина n порядка 10.

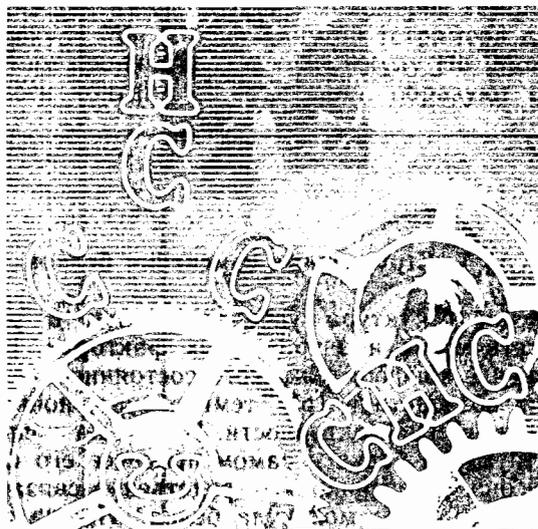
Кооперативные фазовые переходы в макромолекулярной конструкции обусловлены разрывом и фиксацией небольшого числа n связей. Это определяется наличием конструкционных элементов в системе и силами упругости. В обычных макроскопических системах фазовые превращения связаны с процессами на границе фаз, а силы поверхностного натяжения определяют минимальный размер «зародыша» новой фазы и соответствующий ему барьер перехода.

Роль конструкционных элементов и взаимодействий между ними проявляется в наличии особого промежуточного состояния, возникающего в процессе денатурации белков (Е. М. Шахнович, А. В. Финкельштейн, О. Б. Птицын). Промежуточное состояние получается из нативного путем кооперативного температурного плавления в узком интервале температур. Оно энергетически менее выгодно, а энтропийно значительно более выгодно, чем нативное. Это связано с резким ослаблением в нем внутримолекулярных взаимодействий и уменьшением внутримолекулярной упорядоченности. Небольшое набухание в промежуточном состоянии резко ослабляет короткодействующие силы притяжения Ван-дер-Ваальса по сравнению с гидрофобными взаимодействиями. Одновременно происходит резкое увеличение микроконформационной подвижности и флуктуаций структуры белка. Таким образом, по своим свойствам термодинамически стабильное промежуточное состояние близко к нативной

вторичной структуре, но обладает флуктуирующей пространственной структурой (подробнее см. гл. X). С этой точки зрения фазовые переходы в белке могут быть обусловлены не разворачиванием белковой глобулы, а разрушением ее уникальной пространственной структуры. Фазовый переход совершается между более плотным (нативное) состоянием с сильным ван-дер-ваальсовым притяжением, но заторможенными боковыми группами и менее плотным (промежуточное) состоянием, где боковые группы «разморожены», а ван-дер-ваальсовые контакты разрушены. Так как боковые группы прикреплены к жесткому структурному каркасу глобулы, состоящему из α - и β -участков, нарушение плотной упаковки в одном месте белка или белкового домена может произойти лишь при смещении или разрушении этого каркаса по всему объему глобулы. Таким образом, двум состояниям белка соответствуют и два различных объема компактной глобулы, а промежуточные между ними объемы термодинамически неустойчивы. Поэтому локальные нарушения плотной упаковки оказываются невозможными и разрушение нативной структуры белка является фазовым переходом первого рода (см. § 2 гл. VII).

IV

Динамические свойства глобулярных белков



X

Динамика белков

XI

Физические модели
динамической подвижности белков

Глава X

Динамика белков



§ 1. Структурные изменения белков

Нативная трехмерная структура устанавливается в результате действия целого ряда энергетических и энтропийных факторов. В биохимии хорошо известно, что изменение конформационного состояния молекулы белка за счет различных внешних воздействий (рН, температура, ионный состав) отражается и на его функциональной активности. Возникает вопрос: насколько остается стабильной структура белка в самом процессе его функционирования и не претерпевает ли она изменений, непосредственно связанных с протеканием реакции, в которую вовлечена молекула белка? Иными словами, вопрос заключается в том, обладает ли структура биополимеров собственной конформационной подвижностью, в чем состоит ее природа и каково ее функциональное значение? Сформулированная таким образом проблема имеет огромное значение для понимания молекулярных механизмов функциональной активности биомакромолекул и участия их в фундаментальных биологических процессах. Следовательно, речь идет о выполнении принципа единства структуры и функции в биологии на макромолекулярном уровне.

Известно, что характерные времена многих внутримолекулярных превращений, в том числе ферментативных процессов в биоструктурах, не превышают $10^{-2} - 10^{-3}$ с, а подчас могут быть и на несколько порядков короче. Очевидно, сопровождающие их конформационные перестройки также должны происходить весьма быстро. Однако за столь короткие времена они не могут затронуть сразу глубоко всю макромолекулярную структуру и поэтому должны на первых стадиях носить локальный микроконформационный характер, вызывая смещения лишь отдельных атомных групп. Распространение таких локальных смещений на остальные области макромолекулярной структуры приведет уже к общему конформационному изменению молекулы биополимера. Только в последние годы благодаря разработке и внедрению новых методов удалось преодолеть экспериментальные трудности и получить непосредственную информацию о такого рода внутримолекулярной подвижности биополимеров.

Вначале будут приведены данные о конформационных изменениях белков, тесно связанных с их функциональной активностью, а затем рассмотрены природа и физические механизмы конформационной подвижности биомакромолекул.

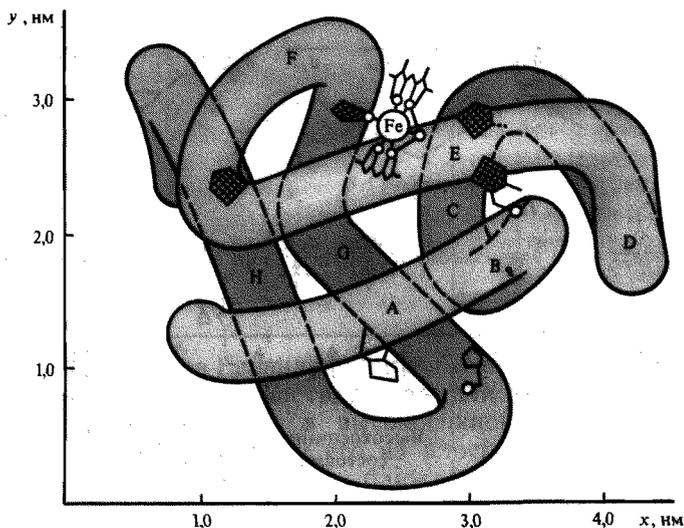
Перестройки в гемоглобине и миоглобине. Рассмотрим в качестве примера конформационные перестройки глобулярных белков-переносчиков молекулярного кислорода—миоглобина (Mb) и гемоглобина (Hb). Строение этих белков в кристаллической форме детально изучено методом рентгеноструктурного анализа (рис. X.1).

Пространство между α -спиральными участками, в том числе и полость активного центра гемовой группы внутри молекулы Mb, заполнено гидрофоб-

ными боковыми цепями аминокислот. В окружающую водную среду выступает большинство полярных белковых цепей. Молекула Hb состоит из четырех субъединиц (две α и две β), образующих почти правильный тетрамер размером $6,0 \times 5,5 \times 6,9$ нм. Каждая из субъединиц мономеров гемоглобина в основных чертах подобна молекуле Mb. Полость внутри тетрамера длиной 5 нм и сечением около $2,0 \times 1,0$ нм пронизывает всю молекулу Hb. Молекулы воды, локализованные в области контактов субъединиц, образуют солевые мостики и

Рис. X.1.
Пространственная структура миоглобина (кашалота) в проекции xu

Миоглобин (переносчик кислорода в мышцах) содержит один гем и одну полипептидную цепь, включающую 153 остатка, которые распределены в основном по 8 α -спиральным участкам (A—H). Гем, в центре которого расположен атом Fe, находится между спиральми E и F



дополнительно стабилизируют тетрамер. Железо может находиться в высоко- и низкоспиновом состоянии в зависимости от способа заполнения d -орбиталей электронами (рис. X. 2).

Характер заполнения орбиталей электронами определяется правилами Хунда, в соответствии с которыми: 1) электроны предпочтительно располагаются на разных орбиталях и 2) если несколько электронов располагается на эквивалентных орбиталях, то состояние с низкой энергией достигается при параллельном расположении спинов. Например, внешние d -электроны в ионах Fe^{2+} и Fe^{3+} располагаются на пяти $3d$ -орбиталях. Fe^{2+} содержит на $3d$ -орбиталях шесть электронов, а Fe^{3+} — пять. По правилам Хунда пять электронов Fe^{3+} занимают каждый свою d -орбиталь, спины электронов параллельны и суммарный спин равен $5/2$. В Fe^{2+} шесть внешних электронов заполняют $3d$ -орбитали таким образом, что на одной из них располагаются два электрона с антипараллельными спинами, а оставшиеся четыре орбитали заполняются каждая одним электроном, так что суммарный спин равен 2.

Такое заполнение электронами внешних d -орбиталей ионов двух- и трехвалентного железа характерно для свободных ионов или ионов в составе соединений с ионной связью. Ситуация меняется, когда Fe^{2+} и Fe^{3+} находятся в комплексах, где они связаны с лигандными атомами ковалентной связью (например, в ионах ферро- или феррицианида) или входят в состав гема.

Пусть ион железа находится в окружении шести отрицательно заряженных лигандов, расположенных на осях x , y , z октаэдрического комплекса. В этом

случае наибольшее влияние лигандов будут испытывать электроны, находящиеся на d -орбиталях, лепестки которых ориентированы вдоль координатных осей, т. е. на орбиталях d_{z^2} и $d_{x^2-y^2}$. В то же время лепестки трех других d -орбиталей (d_{xy} , d_{yz} , d_{zx}) будут испытывать меньшее влияние электрического поля лигандов. В силу этого d -электроны иона железа будут предпочтительно занимать орбитали d_{xy} , d_{yz} , d_{zx} . Таким образом, электрическое поле лигандов

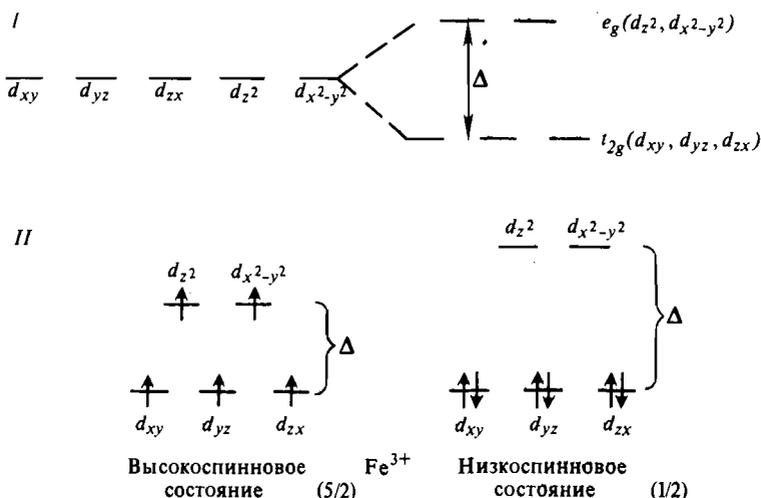


Рис. X.2.

Расщепление d -орбиталей в октаэдрическом комплексе (I): и распределение d -электронов по орбиталям высокоспинового (расщепление Δ мало) и низкоспинового (расщепление Δ велико) состояний иона Fe^{3+} (II)

Символы e и t относятся к дважды и трижды вырожденным орбиталям

приводит к тому, что d -орбитали начинают различаться по энергии: орбитали d_{z^2} и $d_{x^2-y^2}$ обладают более высокой энергией, чем другие d -орбитали (d_{xy} , d_{yz} , d_{zx} ; рис. X.2).

В зависимости от разности энергии орбиталей Δ ион Fe^{3+} может находиться в разных спиновых состояниях. Если энергия, требующаяся для помещения двух электронов на одну из нижних d -орбиталей (т. е. энергия отталкивания двух электронов на одной d -орбитали больше Δ), то электроны займут d -орбитали на верхнем и нижнем уровнях. Например, пять d -электронов Fe^{3+} разместятся на каждой из d -орбиталей по одному. Суммарный электронный спин Fe^{3+} в этом случае равен $5/2$, т. е. Fe^{3+} находится в высокоспиновом состоянии. Однако если Δ значительно больше энергии спаривания d -электронов на одной d -орбитали, то d -электроны Fe^{3+} разместятся на нижних d -орбиталях таким образом, что суммарный спин будет равным $1/2$ (низкоспиновое состояние; рис. X.2). Аналогично, Fe^{2+} в высокоспиновом состоянии обладает суммарным спином d -электронов, равным 2, а в низкоспиновом—0.

Строение комплексных соединений, их физико-химические свойства описывает теория лигандов, учитывающая не только рассмотренный выше эффект, но и природу химической связи в комплексах, что позволяет точнее описывать состояние центрального иона в комплексах.

Следует подчеркнуть, что спиновое состояние центрального атома в комплексах определяется характером лигандного окружения: симметрией, силой связывания лигандов в комплексе. В силу этого изменения в лигандном окружении могут приводить к изменениям в спиновом состоянии иона металла, что, в свою очередь, может вызывать изменения конформации белка, с которым связан ион металла.

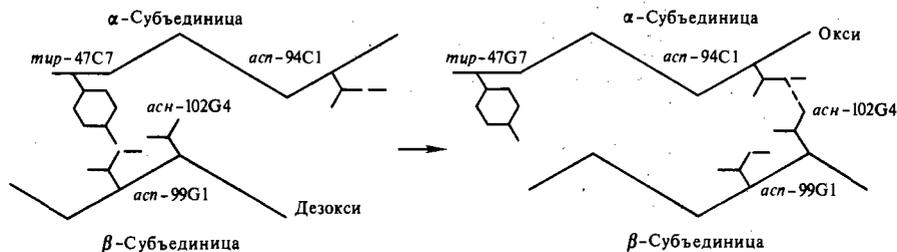


Рис. X.3.

Структурные изменения, происходящие в гемоглобине при оксигенации (объяснение см. в тексте) (по Д. Мешлеру, 1980)

Изменения спинового состояния ионов Fe, индуцированные присоединением субстратов, сменой температуры, были продемонстрированы для ряда гемопро-теинов. Переход иона Fe из низкоспинового в высокоспиновое состояние увеличивает диаметр иона и приводит к выходу его из плоскости гема, что обуславливает и конформационные изменения в ближайшем «белковом» окружении гема.

В высокоспиновом ферросостоянии Fe^{2+} обладает координационным числом 5 и расположен вне плоскости гема на расстоянии около 0,05—0,07 нм. Он координационно связан с четырьмя атомами азота пиррольных групп плоского порфиринового кольца, а в 5-м положении взаимодействует с атомом N имидазольного кольца гистидина. Оксигенация и образование связи кислород—железо не меняют валентности атома железа (Fe^{2+}), но переводят его из высокоспинового состояния в низкоспиновое, увеличивая число лигандов в координационной сфере до шести. В 6-м положении железо координируется с кислородом или с другими лигандами.

Присоединение кислорода индуцирует ряд конформационных изменений в молекуле Hb, раскрытых в работах М. Ф. Перутца. Связывание кислорода с переводом атома Fe^{2+} в низкоспиновое состояние сопровождается одновременным смещением железа на 0,07 нм в плоскость гемовой группы. Это смещение передается через гистидин (*F-8*), и спираль (*F*) вместе с гистидином «подтягивается» в сторону гема к центру молекулы, выталкивая из полости остаток тирозина. Затем происходит поэтапный разрыв солевых мостиков между α -субъединицами и смещение субъединиц вдоль контактов $\alpha_1-\beta_2$ и $\alpha_2-\beta_1$ на 0,7 нм (рис. X.3). Расстояние между гемами α -субъединиц увеличивается с 3,49 до 3,60 нм, а между гемами β -субъединиц, наоборот, сокращается с 3,9 до 3,3 нм. Центральная полость при этом сжимается. Разрыв шести солевых мостиков и освобождение протонов (эффект Бора) характерны для изменений, происходящих в Hb. Энергия взаимодействия между субъединицами уменьшается на 25—50 кДж/моль. Конформация самих α - и β -субъединиц также изменяется, в частности на С-концах цепи. В целом оксигенация пере-

водит каждую из субъединиц из дезокси- в оксиконформацию. Разрыв четырех солевых мостиков из шести при оксигенации первых двух α -субъединиц способствует разрыву двух остальных мостиков и, следовательно, облегчает присоединение следующих молекул кислорода к остальным субъединицам, увеличивая сродство их к кислороду в несколько сотен раз. В этом и состоит кооперативный характер присоединения O_2 к Hb, при котором начало оксигенации Hb облегчает связывание остальных молекул O_2 .

Для миоглобина также удалось установить ряд конформационных изменений при его функционировании. Молекула Mb состоит из трех блоков *ABCDE*, *F* и *GH* (см. рис. X.1), способных к взаимному перемещению. Крайним положениям участков *ABCDE* и *GH*, перемещающихся относительно среднего *F*, соответствуют четыре возможных конформера Mb. Замена лиганда у атома Fe индуцирует конформационные перестройки и, в частности, перестройку солевого кластера на N-конце молекулы. Присоединение O_2 или CO к Mb вызывает сильное снижение энтропии (до $-250-270$ Дж/моль) и изменение состояния протонов как вблизи гемовой группы, так и вдали от нее. Конформационная подвижность различных участков глобина зависит и от pH среды. Показано также раздвижение «стенки» гемсодержащей полости по крайней мере на 0,3—0,4 нм.

Неравновесные конформационные состояния. Описанные конформационные перестройки глубоко затрагивают структуру белков и представляют собой каскад последовательных взаимообусловленных внутримолекулярных актов, идущих направленно и тесно связанных с функционированием переносчиков O_2 . Эти превращения идут самопроизвольно после первоначального «толчка» при соединении атома Fe с O_2 и последующего смещения атома Fe в полость гемовой группы. Это локальное конформационное изменение в молекуле белка затем распространяется и на остальную ее часть. Физическая причина данного процесса состоит в том, что первоначальное равновесие сил и, следовательно, равновесная дезоксиконформация белка оказались необратимо нарушенными в результате присоединения кислорода. Новая равновесная оксиконформация и равновесие сил устанавливаются при другом взаимном расположении атомных групп в белке, что и находит свое отражение в происходящих конформационных изменениях. Весь процесс достижения конечной равновесной оксиконформации проходит через ряд последовательных неравновесных стадий как релаксация первоначально неравновесного состояния, образованного быстрым присоединением O_2 к исходно равновесной дезоксиформе.

Экспериментальное изучение релаксации неравновесных состояний в Hb и Mb проводят импульсными методами, позволяющими создать за короткое время большие концентрации неравновесных форм, отличающихся определенными спектральными свойствами. Последующее изменение во времени этих свойств, например коэффициентов поглощения при определенных длинах волн, позволяет судить о кинетике превращения соответствующих неравновесных состояний.

Эксперименты по фотодиссоциации карбоксигемоглобина, проводимые методом импульсного фотолиза с помощью пикосекундных лазерных импульсов, показали образование короткоживущих неравновесных состояний восстановленного гемоглобина. Оказалось также, что собственно фотодиссоциация Hb O_2 проходит через $10^{-5}-10^{-7}$ с и связана с конформационными изменениями в области гема. Ей, однако, предшествует образование короткоживущего промежуточного состояния $\tau \leq 10^{-9}$ с.

Методом импульсного радиолитического достижения быстрого ($\tau \leq 10^{-6}$ с) восстановления иона металла в активном центре металлопротеина электронами,

которые образуются во время радиолиза. Таким образом проводили восстановление ферригемоглобина и его комплексов с OH^- , F^- , CN^- , N_3^- термолизо-ванными электронами (Л. А. Блюменфельд). Восстановление атома железа до Fe^{2+} происходит в этих условиях в конформации белка, соответствующей исходной ферриформе (Fe^{3+}), так что белок в первые моменты находится в неравновесном состоянии. При низкой температуре (77 К) неравновесные восстановленные формы можно зафиксировать и идентифицировать по характерным особенностям в спектрах поглощения. Гемовое железо Fe^{2+} в этих неравновесных белках находится в низкоспиновом состоянии в отличие от равновесных белков, где оно исходно высокоспиновое. Конформационная релаксация к равновесному состоянию протекает в несколько стадий с константами скоростей порядка от $1-10^2$ до 10^4-10^5 с^{-1} .

Как видно, времена жизни промежуточных неравновесных состояний металлопорфиринов достаточно велики по сравнению с характерными временами обычных ферментативных процессов. Восстановленные металлопорфирины в неравновесных состояниях могут обладать повышенной реакционной способностью. Так, неравновесные низкоспиновые комплексы феррогемоглобина и ферромиоглобина с CN^- и N_3^- гораздо быстрее отдают электроны, окисляясь феррицианидом, чем высокоспиновые равновесные формы этих же белков. Повышенная реакционная способность неравновесных восстановленных белков в окислительно-восстановительных реакциях, где они служат донорами электрона, может объясняться тем, что они исходно обладают конформацией, соответствующей их окисленному состоянию. За время существования этой неравновесной конформации отрыв электрона происходит в условиях, не требующих дополнительной перестройки белка, что и должно обеспечить его окисление.

Рассмотренные на примере Hb и Mb конформационные изменения, протекающие в процессе функционирования белков, присущи и другим белкам (цитохромы, пероксидаза, ферредоксин). Характерная особенность описанных изменений, имеющая принципиальное значение для понимания механизмов функционирования биомакромолекул, состоит в том, что они имеют явно выраженное функциональное значение (например, облегчают присоединение O_2 к Hb). В свою очередь, это обстоятельство является следствием определенной внутримолекулярной организации белка, отличающей его от случайной конфигурации атомов, подчиняющихся только статистическим закономерностям. Функционально направленные конформационные перестройки в белке скорее можно уподобить работе некоего механизма или машины, где взаимное перемещение отдельных частей носит направленный характер.

Действительно, в механике понятие машины подразумевает определенное устройство с одной выделенной степенью свободы, служащее для преобразования одного вида энергии в другой. Например, перемещение поршня в паровой машине под давлением пара протекает в нужном направлении в силу заданной жесткой конструкции системы и преобразует тепловую энергию в механическую. Эта машина, разумеется, весьма далека от реальной белковой молекулы. Однако основное сходство заключается в том, что в обоих случаях конечный результат «рабочего цикла» состоит в трансформации энергии (перенос O_2 , электрона) при переходе из начального в конечное состояние за счет взаимодействия составных элементов системы. Ясно, что конструкцию белковой молекулы нельзя полностью уподобить механической системе, хотя бы из-за ее недостаточной жесткости, наличия большого числа атомов и атомных групп и возможности их колебаний при обычных температурах. Однако определенный функционально значимый характер внутримолекулярных конформационных превращений, протекающих в нужном направлении, свидетельствует о суще-

ствовании некоторых выделенных степеней свободы. Таким образом, в макромолекулах сочетаются статистические и механические закономерности, что и составляет ее своеобразие как физического объекта.

§ 2. Конформационная подвижность белков по данным различных методов

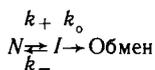
Рассмотренные выше конформационные превращения в белках, установленные методом рентгеноструктурного анализа, относятся к области относительно крупномасштабных макромолекулярных сдвигов, которые отражают суммарный результат более мелких локальных конформационных изменений. Очевидно, в белковой молекуле существует ряд различных конформационных подсостояний, которые быстро возникают в результате короткоживущих возмущений и флуктуаций основной структуры и между которыми быстро устанавливается равновесие. Напомним, что энергия тепловых колебаний $k_B T \sim \sim 2$ кДж/моль при 300 К сравнима по величине с глубинами минимумов на конформационных энергетических картах биополимеров (см. гл. IX). Это является причиной флуктуаций с изменением взаимного расположения атомов, не связанных валентными связями в основной цепи. Так, флуктуации молекулярного объема у молекул с молекулярной массой до 14 000 могут составить при 300 К 0,03—0,04 нм³, а флуктуации поверхности—до 0,01 нм², т. е. 0,1% всей площади поверхности молекулы. Длина водородной связи—основного фактора, стабилизирующего вторичную структуру, может меняться при тепловых флуктуациях (300 К) на 0,01 нм, а углы—на 20—25°.

Отсюда ясно, что различные части белковой структуры участвуют в быстрых спонтанных движениях, отличающихся друг от друга по ряду параметров. «Увидеть» эти быстрые внутренние движения, измерить их характерные времена, определить места локализации в белковой глобуле стало возможным главным образом благодаря внедрению современных физических методов. Среди них решающую роль в исследовании динамики белка сыграли резонансные методы радиоспектроскопии (электронный парамагнитный, ядерный магнитный резонансы, ядерный гамма-резонанс), методы люминесценции, водородного обмена. Полная картина динамики белка еще весьма далека от своего завершения. Физические механизмы конформационной подвижности белка интенсивно изучают в настоящее время. Предлагаемые для их понимания модели динамической подвижности тесно связаны с физическими основами и временным разрешением используемых методов исследования.

Метод изотопного обмена

Исторически возникновение понятия о конформационной подвижности белков связано с развитием метода изотопного обмена атомов водорода. Явление изотопного обмена состоит в том, что атомы водорода, входящие в основном в амидные пептидные группы, могут вступать в обратимую реакцию обмена с атомами дейтерия и трития, находящимися в окружающем растворителе. К. У. Линдерштрем-Ланг первым обратил внимание на тот факт, что изотопный обмен протекает даже в свернутой компактной конформации белка, но более медленно, чем в рыхлом денатурированном состоянии. Очевидно, недоступные для растворителя пептидные группы могут тем не менее на короткое время экспонироваться в раствор вследствие конформационных переходов типа свертывания—развертывания, которые непрерывно происходят в белковой глобуле.

Механизм обмена можно представить в виде схемы



где N —нативное усредненное состояние белка, в котором внутренние NH-группы практически не обмениваются; I —промежуточное состояние белка, в котором некоторые NH-группы становятся доступными для растворителя, а значит, и для обмена; k_+ , k_- —константы реакций первого порядка конформационных переходов; k_0 —константа скорости обмена в условиях полной доступности для растворителя NH-группы. Зависимость скорости обмена от pH позволила установить, что водородный обмен белков проходит по схеме так называемого EX_2 механизма, условием которого является

$$k_+ \gg k_0, \tag{X.2.2}$$

согласно которому скорость конформационных переходов $N \rightleftharpoons I$ намного выше скорости изотопного обмена в условиях полной доступности.

Наблюдаемая константа скорости обмена (β) равна

$$\beta = \frac{k_+}{k_+ + k_-} k_0 = p k_0, \tag{X.2.3}$$

где p —коэффициент замедления обмена в нативном белке по сравнению с обменом в условиях полной доступности, соответствующий доле «динамически» доступных для обмена NH-групп в каждый момент времени. Обычно характерные значения p для различных NH-групп лежат в пределах 10^{-2} — 10^{-5} , а для наиболее экранируемых групп $p \approx 10^{-9}$.

Опираясь на экспериментальные данные по скорости водородного обмена, можно определить такие термодинамические характеристики $N \rightleftharpoons I$ переходов, как изменение полной свободной энергии (ΔG°). В том случае, когда способные к обмену конформационные состояния I трудно образуются ($k_- \gg k_+$), белок в основном находится в виде необменноспособных нативных N -конформаций. Тогда

$$\beta = p k_0 \approx \frac{k_+}{k_-} k_0; \tag{X.2.4}$$

$$p \approx \frac{k_+}{k_-} = K, \tag{X.2.5}$$

где K —константа равновесия между формами N и I ;

$$-\ln p = -\ln K = \Delta G^\circ / (2, 3 RT). \tag{X.2.6}$$

Значения констант равновесия, полученные по изотопному обмену, совпадают с величинами, выведенными из данных по тепловой денатурации, и составляют 10^{-2} — 10^{-10} , а $\Delta G \approx 40 \div 60$ кДж/моль. Видно, что около 10^{-10} части времени нативный белок проводит в денатурированном (развернутом) состоянии.

Температурная зависимость скорости водородного обмена показывает, что вдали от температуры денатурации реакция обмена характеризуется малыми значениями энергии активации, а вблизи нее—высокими. В области низких энергий активации кинетические кривые многокомпонентны, а при высоких энергиях активации они упрощаются и могут быть аппроксимированы одной-двумя экспонентами.

Очевидно, в белке могут происходить два типа конформационных изменений. Переходы одного типа температурно зависимы и аналогичны общему кооперативному разворачиванию белковой глобулы при обратимой денатурации с большими тепловыми и энтропийными эффектами (ΔG° , ΔH° , $\Delta S^\circ \gg 0$). Конформационные переходы другого типа можно назвать локальными. Свя-

занный с ними обмен проходит без общего теплового разворачивания белковой глобулы, а обусловлен именно «локальной подвижностью» белковой матрицы. Кинетические кривые этого типа многокомпонентны, скорость самого обмена слабо зависит от температуры, а изменения термодинамических параметров характеризуются отрицательными значениями ΔS и величинами ΔH , близкими к нулю. Они отличаются, таким образом, от переходов общего денатурационного типа. Видимо, слабо зависящие от температуры локальные движения отражают динамику жестких плотноупакованных участков белковой матрицы.

Изучение кинетических кривых изотопного обмена широко используют для оценки динамической подвижности белка в разных конформационных состояниях. Оказалось, например, что отрыв гема от гемоглобина или диссоциация этого белка на субъединицы приводят к небольшому увеличению объема апобелка и возрастанию конформационной подвижности с одновременным исчезновением рН-зависимых изменений внутримолекулярной подвижности. В лигандных формах гемоглобина по сравнению с нелигандной дезоксиформой смещение атома Fe вместе с гистидином к гемовой плоскости увеличивает локальную подвижность. У цитохрома *c* скорость обмена в окисленной менее компактной форме—феррицитохроме—выше, чем в восстановленной—ферроцитохроме.

Метод изотопного обмена дает уникальную возможность регистрировать ничтожные концентрации конформационно неравновесных состояний. Однако он не позволяет установить, какая часть молекулы белка и каким образом должна перестроиться, чтобы ее NH-группы оказались доступными растворителю. К сожалению, этим методом нельзя также определить и частоту конформационных движений, которая представляет собой важную характеристику внутримолекулярной подвижности белка. Ценность метода изотопного обмена определяется информацией о локальных конформационно неравновесных состояниях, которые, накапливаясь в достаточных концентрациях, могут способствовать конформационным переходам, сопровождающим функциональные процессы в белках.

Люминесценция и ее применение для изучения динамики белков

Как известно, поглощение кванта света молекулами переводит их в возбужденное состояние в результате переброски одного электрона на более высокий энергетический уровень. Обратный переход из возбужденного в основное состояние может сопровождаться испусканием кванта света люминесценции. Чаще всего таким фотоэлектроном сложных органических молекул является π -электрон, участвующий в образовании системы делокализованных двойных сопряженных связей молекулы. Сами переходы с поглощением и испусканием света в системе π -электронов представляют соответственно переходы $\pi \rightarrow \pi^*$ и $\pi^* \rightarrow \pi$ между основным (S_0) и так называемым синглетным (S^*) возбужденным состоянием. Они соответствуют переходам между связывающими π - и разрыхляющими π^* -орбиталями.

Электронные уровни в молекуле. На рис. X.4 изображены кривые потенциальной энергии основного (S_0) и возбужденного (S^*) состояний (ср. рис. VIII.1). Потенциальная электронная энергия включает кулоновские взаимодействия всех электронов и ядер между собой и друг с другом без учета кинетической энергии ядер. Поскольку электроны движутся со скоростями, на 2—3 порядка превышающими скорости движения ядер, то можно считать, что электроны изменяют свое положение при практически неподвижных

ядрах. Следовательно, электронная энергия $U(R)$ зависит от межъядерного расстояния R как от параметра.

Разделение внутримолекулярных движений на быстрые электронные и медленные ядерные обуславливает один из фундаментальных законов спектроскопии, связанный с так называемым принципом Франка—Кондона. Каждое электронное состояние S_0 и S^* характеризуется своей потенциальной кривой $U^0(R)$, $U^*(R)$, переходы между которыми соответствуют переходам электрона

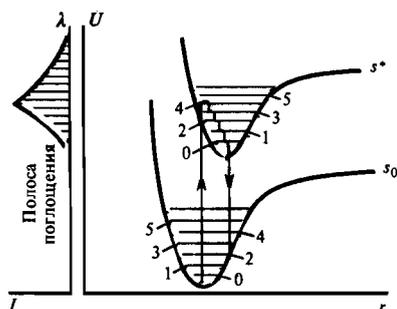


Рис. X.4.

Кривые потенциальной энергии основного (S_0) и синглетного возбужденного (S^*) состояний двухатомной молекулы: U — потенциальная энергия; r — межъядерное расстояние; I — интенсивность поглощения; λ — длина волны; 0—5 — колебательные подуровни ядерных состояний

между разными энергетическими уровнями. Движение (колебание) самих ядер происходит в поле, создаваемом быстро движущимися электронами, и $U(R)$ есть потенциальная энергия для движения ядер. Решение квантовомеханической задачи для движения ядер показывает, что энергия ядерных колебаний принимает дискретные значения, т. е. квантуется так же, как и энергия электронов. Соответствующие колебательные подуровни (1, 2, 3) для ядер приведены на каждой из кривых электронной энергии (рис. X.4). Поглощение света и переход $S_0 \rightarrow S^*$ происходит за $10^{-15} - 10^{-16}$ с, т. е. практически мгновенно, так что тяжелые ядра не успевают изменить своих положений и скоростей (принцип Франка—Кондона). Как видно из рис. X.4, при этом переходе, изображенном вертикальной стрелкой, повышается запас внутренней колебательной и потенциальной электронной энергии.

Причина этого состоит в том, что кривые $U^0(R)$ и $U^*(R)$ неидентичны и исходное межъядерное расстояние для состояния $U^0(R)$ соответствует более высоким колебательным подуровням на кривой $U^*(R)$ состояния S^* . Этот избыточный запас колебательной энергии диссипирует в теплоту в течение $10^{-12} - 10^{-11}$ с, и ядра попадают на нижние подуровни (волнистая кривая, рис. X.4) состояния S^* , откуда и происходит переход на основной уровень S_0 с испусканием кванта света флуоресценции.

Запас колебательной энергии молекулы при этом переходе опять возрастает с последующей диссипацией его за $10^{-12} - 10^{-11}$ с. Поглощение кванта света настолько быстро переводит молекулу в новое электронное состояние, что ядерная конфигурация остается характерной все еще для основного состояния S_0 . Вся система оказывается в возбужденном колебательном состоянии, которое успевает перейти в равновесное за $10^{-12} - 10^{-11}$ с. Колебательная релаксация происходит за время существования электронного возбужденного состояния S^* , которое для ароматических соединений составляет в среднем $10^{-9} - 10^{-8}$ с.

Таким образом, в силу принципа Франка—Кондона «вертикальные» переходы между электронными состояниями происходят при практически неподвижных ядрах и сопровождаются кратковременным (на $10^{-12} - 10^{-11}$ с) повышением колебательной энергии молекулы. «Невертикальные» переходы го-

раздо менее вероятны. Положение максимума спектральной полосы флуоресценции определяется наиболее вероятным переходом $S^* \rightarrow S_0$, а сама величина квантов флуоресценции — потерями энергии электронного возбуждения при переходе на колебательные подуровни состояния S_0 .

Помимо испускания света флуоресценции состояние S^* может дезактивироваться и другими путями. Возможен безызлучательный переход на основной уровень $S^* \rightarrow S_0$, когда вся энергия электронного возбуждения переходит

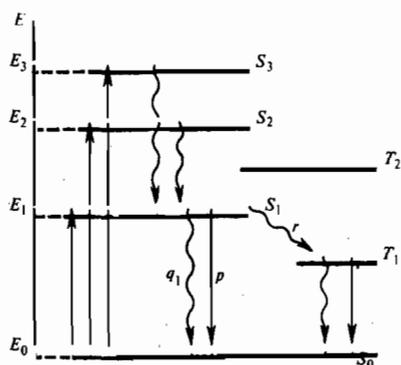


Рис. X.5.

Электронные уровни органической молекулы и переходы между ними:

p — вероятность переходов в единицу времени на основной уровень с испусканием флуоресценции, q_1 — то же, без излучения; r — вероятность конверсии в триплетное состояние

Молекула обладает системой триплетных T_1, T_2, \dots и синглетных возбужденных уровней S_1, S_2, \dots, S_n . При переходе на один из высших возбужденных синглетных уровней избыток энергии быстро (10^{-12} с) диссипирует; молекула попадает на низший возбужденный синглетный уровень S_1 , с которого и происходит переход ($S_1 \rightarrow S_0$) или внутримолекулярная конверсия ($S_1 \rightarrow T_1$). Суммарная вероятность (P) дезактивации определяется суммой величин p, q_1, r :

$$P = p + q_1 + r$$

в теплоту. Наряду с синглетными (S) молекула обладает и триплетными (T) электронными уровнями, расположенными в шкале энергий ниже, чем синглетные. Безызлучательный переход из состояния S^* в состояние T называется интеркомбинационной конверсией $S^* \rightarrow T$. Он связан с изменением ориентации спина фотозлектрона на противоположную на уровне S^* , в результате чего спины двух ранее спаренных π -электронов, образующих химическую связь в основном состоянии S_0 , теперь становятся параллельными. В силу этого триплетная молекула обладает двумя неспаренными электронами и проявляет парамагнитные свойства, как бирадикалы.

Переход из триплетного состояния в основное $T \rightarrow S_0$ также требует переориентации спина, в связи с чем вероятность этого перехода мала. Поэтому время жизни триплетного состояния намного больше, чем синглетного S^* , и составляет $10^{-6} - 10^{-2}$ с и больше. Переходы $T \rightarrow S_0$ сопровождаются фосфоресценцией или могут происходить безызлучательно. Возможен обратный переход из триплетного в синглетное возбужденное состояние $T \rightarrow S^*$ за счет тепловой энергии, после чего наблюдается замедленная флуоресценция, сходная по спектрам с обычной флуоресценцией $S^* \rightarrow S_0$, а по длительности — с фосфоресценцией. Поскольку триплетная молекула T живет достаточно долго, она может успеть поглотить второй квант и перейти на второй триплетный уровень ($T_1 \rightarrow T_2$ -поглощение).

На рис. X.5 представлена общая схема электронных уровней и переходов между ними.

Время жизни состояния. Время жизни τ состояния S_1 определяется суммарной вероятностью его дезактивации:

$$\tau = 1/(p + q_1 + r); \quad (\text{X.2.7})$$

$$p + q_1 + r = 1/\tau = 10^8 \div 10^9 \text{ с}^{-1}. \quad (\text{X.2.8})$$

В соответствии с экспоненциальным законом убыли числа синглетных возбужденных молекул

$$N_1 = N_0 e^{-t(p+q_1+r)} = N_0 e^{-t/\tau}, \quad (\text{X.2.9})$$

где N_1 количество возбужденных молекул в состоянии S_1 ; N_0 — общее число молекул хромофора; затухание флуоресценции носит также экспоненциальный характер и происходит за время $\tau \sim 10^{-9} \div 10^8$ с.

Квантовый выход флуоресценции. Величина квантового выхода (B) определяется как отношение количества квантов флуоресценции, испущенных с уровня S_1 , к поглощенным квантам и зависит от вероятности дезактивации синглетного возбужденного состояния по излучательному пути. В отсутствие каких-либо процессов тушения

$$B = p / (p + q_1 + r) \quad (\text{X.2.10})$$

или с учетом (X.2.8)

$$B = p\tau. \quad (\text{X.2.11})$$

Если в течение времени жизни возбужденного состояния в среде происходят и другие процессы тушения помимо внутримолекулярной тепловой дезактивации, то они сокращают выход и длительность флуоресценции:

$$\begin{aligned} \tau' &= 1 / (p - q_1 + r + Q); \tau' < \tau; \\ B' &= p / (p + q_1 + r + Q); B' < B, \end{aligned}$$

где Q — вероятность дополнительной дезактивации состояния (например, за счет столкновения с тушащими примесными молекулами).

В триплетном состоянии длительность и выход фосфоресценции подчиняются аналогичным феноменологическим соотношениям. В тех случаях, когда переход в возбужденное состояние значительно изменяет электрический дипольный момент молекулы по сравнению с дипольным моментом в состоянии S_0 , поле диполей окружающей среды также оказывается неравновесным. Диполи среды за время жизни молекулы-хромофора в возбужденном состоянии могут успеть переориентироваться в соответствии с новым полем диполя возбужденного хромофора. Очевидно, релаксация диполей лимитируется динамическими свойствами среды. Ясно, что если время дипольной релаксации τ_p много больше времени жизни возбуждения хромофора τ^* ($\tau_p \gg \tau^*$), то релаксация за время τ^* не успевает произойти, т. е. окружение хромофора жесткое. Наоборот, при $\tau_p \ll \tau^*$ быстрая дипольная релаксация успевает произойти за время τ^* существования возбуждения в молекуле хромофора. Это снижает энергетический уровень возбужденного электрона, вызывая сдвиг максимума спектра флуоресценции в длинноволновую сторону.

Рассмотрим систему хромофор — окружающая среда как единую с помощью диаграммы рис. X.5. Можно считать, что в случае $\tau_p \ll \tau^*$ релаксация успевает пройти на нижние ядерные подуровни возбужденного состояния, откуда и высвечивается квант люминесценции. Наоборот, при $\tau_p \gg \tau^*$ высвечивание происходит с верхних колебательных подуровней, что вызывает сдвиг максимума спектра свечения в коротковолновую сторону. В сложной системе (белок), где изменение электронного состояния молекулы-хромофора вызывает реорганизацию его микроокружения, время релаксации среды может быть больше времени жизни электронного возбуждения ($\tau_p > \tau^*$). Этого не наблюдается в изолированных молекулах-хромофорах, где внутримолекулярная колебательная релаксация занимает $10^{-12} - 10^{-11}$ с, т. е. намного меньше времени τ^* состояний S_1 и T_1 .

Изменяя релаксационные свойства среды (при изменении температуры), можно влиять на соотношение между τ_p и τ^* . Это находит свое отражение в положении максимума (λ_{\max}) спектра флуоресценции согласно уравнению

$$\frac{1}{\lambda_{\max}} = \frac{1}{\lambda_{\infty}} + \left(\frac{1}{\lambda_0} - \frac{1}{\lambda_{\infty}} \right) \frac{\tau^*}{\tau_p + \tau^*}, \quad (\text{X.2.12})$$

где λ — положение максимума спектра соответственно при $\tau_p \ll \tau^*$; λ_0 — при $\tau_p \gg \tau^*$. Таким методом можно получить ценную информацию о подвижности белков, изучая собственную флуоресценцию триптофана.

Индол триптофана характеризуется большим изменением момента перехода при возбуждении (до $4D$). Поэтому положение максимума его спектра флуоресценции сильно зависит от подвижности диполей среды и может варьировать

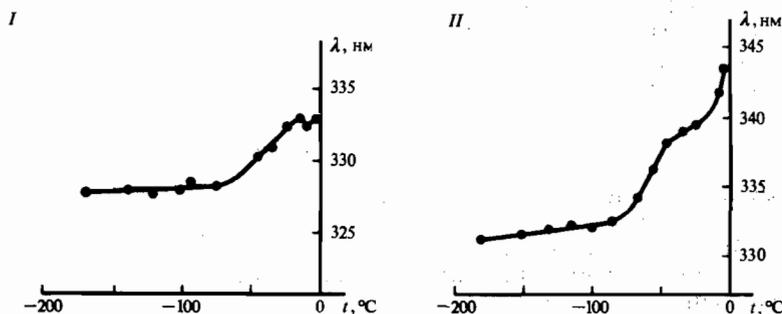


Рис. X.6. Зависимость положения спектра флуоресценции водного раствора β -лактоглобулина (I) и нейротоксина II кобры (II) от температуры при pH 6,5 (по Е. А. Пермякову, 1977)

до 30 нм. Так как τ^* для S^* -состояния триптофана составляет единицы наносекунд, то по этим данным можно судить о структурных перестройках в белке в наносекундном временном диапазоне. Было показано (Э. А. Бурштейн), что белки обладают характерными двухступенчатыми кривыми зависимости положения спектра флуоресценции от температуры в области от -90 до 0°C . Сдвиги полосы флуоресценции на 4—9 нм в области от -90 до -20°C и на 5—12 нм в области от -20 до 0° (рис. X.6) свидетельствуют о замораживании движений в белковой матрице в наносекундном диапазоне. Высушенные белки не дают этих спектральных сдвигов, что подчеркивает роль воды как необходимого фактора для появления подвижности белка (см. § 4 гл. IX). Очевидно, «замораживание» быстрой релаксационной подвижности белка имеет кооперативный характер, причем белковые структуры и связанная вода замерзают как единая микрофаза.

Кинетика затухания флуоресценции триптофана в различных белках оказалась многоэкспонентной. Отсюда следует, что существует набор разных по своим флуоресцентным свойствам конформеров белка и что время установления равновесия между ними больше времени жизни флуоресценции. Тушение флуоресценции за счет столкновений возбужденного хромофора с соседними группами происходит во время структурных флуктуаций частей и участков глобулы. Это находит свое отражение в зависимости квантового выхода от температуры:

$$1/B = 1 + r/p + f(T) \sum_i k_T = a + bf(T), \quad (\text{X.2.13})$$

где $a = 1 + r/p$ не зависит от температуры, а член $f(T) \sum_i k_T$ описывает все температурно зависимые процессы дезактивации. Эксперимент показал, что функция $f(T)$ соответствует T/η , где η — вязкость раствора. Оказалось, что функция T/η хорошо описывает температурную зависимость флуоресценции тирозино-

вых и триптофановых остатков, что свидетельствует об общих динамических закономерностях тушения в белковой матрице, обусловленных частотой структурных изменений.

Подобные структурные флуктуации позволяют низкомолекулярным тушителям флуоресценции, в частности кислороду, диффундировать во внутренние области белка, дезактивируя возбужденные состояния.

Наряду с измерением параметров собственной флуоресценции белка (триптофановых остатков) большое значение имеет изучение свечения экзогенных фосфоресцентных меток (например, производных эозина). Поскольку времена триплетных и синглетных состояний изменяются в широких пределах, это позволяет расширить диапазон измерений характерных времен структурных перестроек от 10^{-9} до 1 с. Этим методом удалось, например, зарегистрировать более медленные движения $\tau_p \sim 10^{-3}$ с в поверхностных слоях и $\tau_p < 1$ с внутри белковых макромолекул в фотосинтетическом реакционном центре.

Метод спиновых меток

Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР). Известно, что в постоянном магнитном поле напряженности H_0 спины электронов будут ориентироваться вдоль поля. Энергетический уровень электрона со спином $s = 1/2$ расщепляется на два уровня в соответствии с параллельным и антипараллельным полю H_0 направлением спина (рис. X.7).

Разность энергетических уровней составляет

$$E_2 - E_1 = \Delta E = g\beta H_0. \quad (X.2.14)$$

Здесь g — безразмерная постоянная (так называемый g -фактор), зависящая от электронной структуры окружения и равная для свободного электрона 2,0023; β — магнетон Бора:

$$\beta = e\hbar / (2m_e c) = 0,93 \cdot 10^{-23} \text{ Дж/Тл},$$

где e и m_e — заряд и масса электрона; c — скорость света; $\hbar = h / (2\pi)$ — постоянная Планка ($6,62 \cdot 10^{-34}$ Дж·с). Очевидно, при общем числе спинов в системе N отношение заселенностей спинов на нижнем (N_1) и верхнем (N_2) уровнях определяется разностью энергий (ΔE) по закону Больцмана:

$$N_1 / N_2 = e^{g\beta H_0 / (k_B T)}, \quad (X.2.15)$$

где $N_1 + N_2 = N$ и $N_1 > N_2$.

Наложим теперь на образец помимо постоянного H_0 и переменное магнитное поле с частотой ν , перпендикулярное постоянному полю. Тогда в системе будут индуцироваться вынужденные переходы между уровнями с вероятностью, одинаковой для переходов $N_1 \rightarrow N_2$ и $N_2 \rightarrow N_1$. Так как исходно $N_1 > N_2$, то число переходов в каждый момент времени с нижнего на верхний уровень $N_1 \rightarrow N_2$ превысит число обратных переходов $N_2 \rightarrow N_1$. При условии

$$h\nu = g\beta H_0 \quad (X.2.16)$$

происходит резонансное поглощение энергии переменного поля. Это явление называется электронным парамагнитным резонансом (ЭПР).

Из (X.2.16) можно найти, что при $H_0 = 1$ Тл резонансная частота для свободного электрона равна $\nu_e = 2,8 \cdot 10^{10}$ с $^{-1}$, т. е. относится к области СВЧ-излучения. При увеличении мощности СВЧ-излучения, действующего на образец, первоначальная разность заселенностей уровней $n = N_1 - N_2$ должна,

очевидно, убывать. В свою очередь, это приведет к исчезновению резонансного поглощения переменного поля, так как

$$n(t) = n(0)e^{-2tp},$$

где $n(0)$ — разность заселенностей при $t=0$; p — вероятность индуцированных переходов между уровнями.

Процессы релаксации в системе спинов. Увеличение СВЧ-мощности приводит сначала к увеличению амплитуды резонансного поглощения переменного магнитного поля (сигнал ЭПР), затем достигается некоторая стационарная

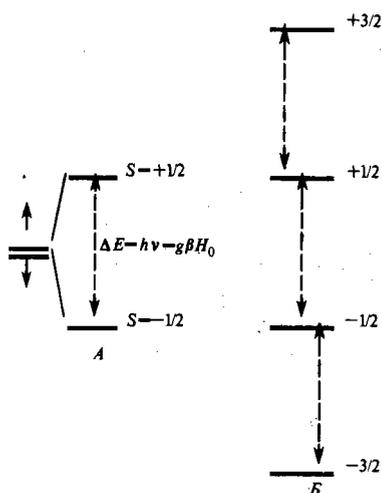


Рис. X.7.

Энергетические уровни электрона в магнитном поле. *A* — один электрон (спин $1/2$); *B* — три электрона (максимальное значение спина $3/2$; объяснение см. в тексте)

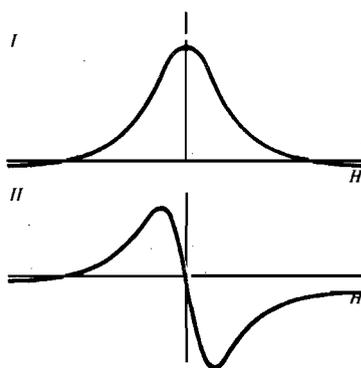


Рис. X.8.

Сигнал ЭПР. *I* — линия поглощения СВЧ-поля; *II* — ее первая производная. Ось абсцисс — величина постоянного магнитного поля H , которая плавно меняется при постоянной частоте СВЧ-поля до достижения значений, соответствующих условию резонансного поглощения (X.2.17)

величина и наступает насыщение. Причина этого связана с взаимодействием системы спинов с их окружением. Это взаимодействие вызывает переориентацию спина и приводит к передаче избыточной магнитной энергии другим степеням свободы, включающим в твердом теле колебания кристаллической решетки. Безызлучательные переходы между двумя состояниями спинов, сопровождающие взаимодействие с окружением, называют спин-решеточной релаксацией. Характеристикой этих процессов является так называемое время спин-решеточной релаксации (T_1), которое отражает среднее время жизни данного спинового состояния и является временем достижения теплового равновесия между системой спинов и тепловыми колебаниями решетки. Большие времена T_1 указывают на малую скорость спин-решеточного взаимодействия.

Учитывая наряду с влиянием радиочастотного поля и эффекты спин-решеточной релаксации, можно найти, что изменение заселенности уровней $n = N_1 - N_2$ описывается уравнением

$$dn/dt = -2pn - (n - n_0)/T_1. \quad (X.2.17)$$

Здесь n_0 — разность заселенностей при тепловом равновесии системы спинов с решеткой:

$$n_0 = N \frac{W_{21} - W_{12}}{W_{21} + W_{12}},$$

где W_{21} и W_{12} — вероятности спонтанных тепловых переходов $N_2 \rightarrow N_1$ и $N_1 \rightarrow N_2$ соответственно. Существенно, что, поскольку решетка находится в тепловом равновесии, вероятности спонтанных спиновых переходов вверх и вниз не равны, как это наблюдалось для переходов, индуцированных радиочастотным полем: $W_{12} \neq W_{21}$, а следовательно, $n_0 \neq 0$.

Время спин-решеточной релаксации равно

$$T_1 = 1 / (W_{12} + W_{21}). \quad (\text{X.2.18})$$

В стационарном состоянии при действии СВЧ-излучения $dn/dt = 0$, откуда из (X.2.18) следует, что

$$n = n_0 / (1 + 2\rho T_1), \quad (\text{X.2.19})$$

где ρ — вероятность индуцированного перехода, пропорциональная квадрату амплитуды радиочастотного поля. Анализ показывает, что при увеличении ρ разность заселенностей n падает, достигая в пределе при $\rho \rightarrow \infty$ насыщения.

На рис. X.8 приведено изображение линии поглощения СВЧ-поля и ее первой производной, которая обычно регистрируется в ЭПР-спектрометрах и собственно является сигналом ЭПР.

Спин-решеточная релаксация. Как связан характер взаимодействий в системе спинов с параметрами сигнала ЭПР? Из рис. X.8 видно, что сигнал ЭПР обладает шириной линии поглощения. Это обусловлено тем, что вследствие процессов релаксации состояние спина имеет определенное время жизни, что вызывает уширение резонансного сигнала из-за соотношения неопределенностей для энергии. Согласно этому соотношению, энергия (E_0) способной к распаду системы, обладающей средним временем жизни (τ), может быть определена лишь с точностью до величины порядка \hbar/τ ; ее обычно называют шириной (Γ) энергетического уровня системы ($\Gamma \sim \hbar/\tau$).

Таким образом (ср. (VIII.1.10)),

$$\Gamma \tau \sim \hbar. \quad (\text{X.2.20})$$

Это и есть соотношение неопределенностей для энергии. Оно означает, что точное положение энергетических уровней (E_0) спинового состояния электрона в системе, обладающей временем релаксации T_1 , может быть определено по положению линии резонанса с точностью до $\hbar/T_1(E_0 \pm \hbar/T_1)$, что и означает уширение линии резонанса E_0 до $\Delta H \sim \hbar/T_1$.

Величина T_1 сильно зависит от температуры, увеличиваясь при замораживании. Так, сигналы ЭПР парамагнитных ионов металлов часто не наблюдаются при комнатной температуре из-за малой величины T_1 и, как следствие, слишком большой ширины. Однако при температурах жидкого гелия сигналы регистрируются, так как увеличение T_1 приводит к сужению линии поглощения и росту ее амплитуды.

Спин-решеточная релаксация не единственный процесс, определяющий ширину линии. Существует много других процессов, вызывающих изменение относительных энергий спиновых состояний за счет обмена энергией в самой системе спинов. Это так называемые процессы спин-спиновой взаимодействия, которые характеризуются временем спин-спиновой релаксации T_2 . Для парамагнитных частиц T_2 практически не зависит от температуры и соответствует скорости установления равновесия между спинами электронов при их

взаимодействии друг с другом. Вклад в общую ширину линии процессов спин-спинового взаимодействия описывается величиной порядка $1/T_2$. В общем случае ширина линии определяется как

$$\Gamma = \Delta H \sim 1/T_{\text{эсп}} \sim 1/(2T_1) + 1/T_2, \quad (\text{X.2.21})$$

где $T_{\text{эсп}}$ определяется в эксперименте.

Для свободных радикалов $T_1 \gg T_2$, поэтому для них в отсутствие насыщения ширина линии определяется в основном T_2 ($\Delta H \sim 1/T_2$), которое составляет $\sim 10^{-8}$ с. Большие величины T_1 (секунды, минуты) для органических свободных радикалов связаны с тем, что энергия спинов электронов передается колебаниям ядер решетки через спин-орбитальное взаимодействие, которое для легких ядер весьма мало. Это обуславливает относительно малую скорость процессов спин-решеточной релаксации свободных радикалов.

Физические механизмы спин-спинового обмена. В твердых телах и вязких растворах ширина линии связана с диполь-дипольными взаимодействиями спинов электронов. Магнитное поле, создаваемое магнитным моментом неспаренного электрона, вызывает дополнительное локальное поле ($H_{\text{лок}}$) в месте расположения другого электрона, равное

$$H_{\text{лок}} \sim \mu \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{R^3}, \quad (\text{X.2.22})$$

где μ — компонент магнитного момента, направленный вдоль магнитного поля магнита; R — длина радиуса-вектора, соединяющего оба электрона; θ — угол между направлениями магнитного поля и радиуса-вектора. Сложение этого локального ($H_{\text{лок}}$) и внешнего (H_0) магнитных полей нарушает условие резонанса (X.2.17), который теперь наблюдается при условии

$$h\nu = g\beta(H_0 + H_{\text{лок}}).$$

Вместо одной резонансной линии от H_0 теперь существует набор близко расположенных линий, являющихся результатом взаимного влияния спинов друг на друга посредством создания локальных полей. Это влияние сокращает время T_2 для всей системы спинов, уширяя линию в силу соотношения (X.2.20).

Результирующая уширенная линия резонанса является огибающей всех близких линий «локальных резонансов». Диполь-дипольное уширение примерно до 0,1 мТл проявляется на расстояниях между спинами 3—4 нм. В жидкостях, где вязкость мала, диполь-дипольные взаимодействия усредняются за счет быстрых молекулярных движений. В этом случае за время, обратное частоте резонанса $t \sim 1/\nu$, успевают произойти многократные флуктуации положения радикалов. В результате отдельные линии «локального резонанса» не удается разрешить и резонанс наблюдается при одной усредненной линии с уменьшенной шириной. Замораживание раствора и уменьшение вязкости вызывают вновь замедление молекулярных движений и уменьшение T_2 спиновых состояний за счет действия локальных полей.

При обычных температурах в жидкостях источником уширения линии служат другие эффекты: химические реакции, перенос электрона, спиновый обмен, приводящие к изменению магнитного окружения неспаренного электрона. Так, обмен спиновыми состояниями при столкновении частиц в растворе уменьшает время жизни (T_2) спинов, что увеличивает ширину линии в силу соотношения неопределенностей (X.2.20). Магнитные моменты ядер, входящих в состав радикальной частицы, создают локальные поля, которые складываются с внешним полем H_0 и тем самым влияют на линии ЭПР, вызывая их расщепление с появлением сверхтонкой структуры (СТС).

Существует два типа взаимодействия электронов и ядер: анизотропное и изотропное. Первое из них аналогично классическому взаимодействию двух магнитных диполей и описывается выражением, аналогичным (X.2.22), в соответствии с которым локальное магнитное поле, создаваемое ядром, зависит от угла Θ .

Если неспаренный электрон локализован на несимметричной орбитали p или d , то результат спин-ядерного взаимодействия будет зависеть от угла между направлением вектора, соединяющего электрон и ядро, и направлением магнитного поля.

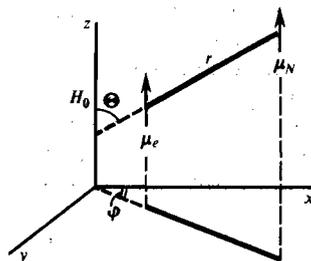
Рис. X.9.

Анизотропное взаимодействие ядерного и электронного магнитных моментов (по К. Н. Тимофееву, 1985):

μ_n — ядерный магнитный момент; μ_e — электронный магнитный момент; r — радиус-вектор; θ и φ — углы, составляемые радиусом вектором r с осями z и x ; H_0 — внешнее магнитное поле, направленное по оси z

Напряженность локального магнитного поля, создаваемого ядром в точке нахождения электрона, зависит от величины r и — угла θ :

$$H_{\text{лок}} = \mu_N \frac{1 - 3 \cos^2 \theta}{r^3}$$



Для симметричной s -орбитали дополнительное магнитное поле, создаваемое ядром и определяющееся выражением (X.2.22), равно 0 вследствие усреднения по всем углам Θ . В этом случае, как показывает теория, сверхтонкое расщепление определяется конечной вероятностью пребывания электрона в точке нахождения ядра. Такое взаимодействие называется контактным. СТС, возникающая из-за контактного взаимодействия ядра и электрона, не зависит от направления и называется изотропной.

Локальные ядерные поля влияют по-разному и на ширину линий ЭПР вследствие различных углов между линией ядро—электрон и направлением поля H_0 (рис. X.9). Быстрое молекулярное движение радикалов в средах с небольшой вязкостью усредняет влияющие на них локальные поля и усредняет анизотропную составляющую, сужая тем самым самую линию ЭПР. Если взаимодействующие спины подвергаются одновременно и действию локальных полей, дающих СТС, то картина усложняется. Наряду с уширением линии вследствие обменных взаимодействий между спинами будет, очевидно, происходить и усреднение действия разных локальных полей, давая «смазывание» линий СТС, стягивание их к некоторому среднему значению и, следовательно, некоторое сужение линий ЭПР.

Вид спектра ЭПР зависит также от влияния несимметричного анизотропного окружения неспаренного электрона в радикальной частице на величину g -фактора, что определяет тонкую структуру спектра. Усреднение здесь также приводит к снятию анизотропии g -фактора при быстрых внутримолекулярных движениях. Таким образом, изменение определенных параметров спектра ЭПР может дать важную информацию о динамических свойствах микроокружения радикальной частицы.

Метод спиновых меток. Основная идея метода состоит в присоединении к той или иной функциональной группе белка свободного радикала и изучению характеристик его сигналов ЭПР. Наиболее удобны в этом отношении нитро-кислородные радикалы, содержащие свободнорадикальную группу $\dot{N}-O$:

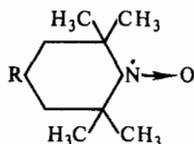


Схема электронного строения группы $\dot{N} \rightarrow O$ приведена на рис. X.10. Неспаренный электрон принадлежит $2p$ -орбиталям азота и кислорода и фактически делокализован между атомами N и O, эффективно взаимодействуя по диполь-дипольному механизму с магнитным моментом спина ядра атома азота. В силу этого происходит расщепление линии поглощения сигнала ЭПР (СТС) на три составляющие, соответствующее трем разным проекциям ядерного спина азота на направление H_0 . Вид спектра определяется главным образом анизотропным взаимодействием.

Вместе с тем существует и небольшая примесь изотропного взаимодействия. На рис. X.11 приведен спектр ЭПР парамагнитной метки на лизоциме. Так как СТС и g -фактор в спектрах ЭПР нитроксильных радикалов анизотропны, то броуновская диффузия влияет на форму спектра. Величина расщеплений СТС будет зависеть от углов между осями парамагнитного фрагмента и направлением поля. Вращение нитроксильного фрагмента относительно поля изменяет

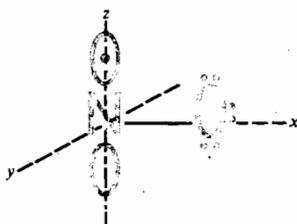


Рис. X.10.

Схема парамагнитного фрагмента нитроксильного радикала

Неспаренный электрон, указанный точкой, локализован на R_z -орбитали атома азота. Эффективное магнитное поле, действующее на электрон, складывается из внешнего магнитного поля и поля, создаваемого ядром азота

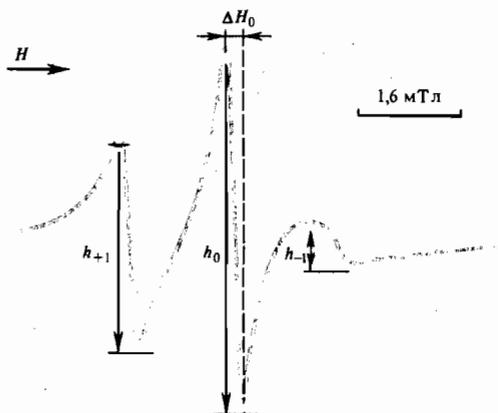


Рис. X.11.

Спектр ЭПР парамагнитной метки, присоединенной к *guc-15* лизоцима (рН 7,0; $t=26^\circ\text{C}$) (по Г. И. Лихтенштейну, 1971):

h_{-1} , h_0 , h_{+1} — интенсивность компонентов, соответствующих $M = -1$; 0; +1; ΔH_0 — ширина центрального компонента

положение линий в поле. В случае предельно быстрых вращений $\nu_{вр} \geq 10^{11} \text{ c}^{-1}$ происходит усреднение всех ориентаций и спектр представляет собой три эквидистантные линии одинаковой интенсивности, что в данном случае обусловлено изотропным взаимодействием неспаренного электрона с ядром азота. Однако уже в области вращений с частотами $10^{11} \text{ c}^{-1} > \nu_{вр} \gg 10^9 \text{ c}^{-1}$ анизотропия СТС и g -фактора начинает проявляться, что изменяет симметричный характер

спектра (высокопольный H_{-1} -компонент наиболее уширен и имеет наименьшую амплитуду). Таким образом, по параметрам спектра ЭПР можно оценить время корреляции движения радикала τ_c — время, за которое частица успеваеет «повернуться» на угол $\pi/2$. Величину $\nu = 1/\tau_c$ условно называют частотой вращения метки. Существуют модели для различных типов и частот движения нитроксильных радикалов, позволяющие найти τ_c .

В случае радикалов, изотропно и быстро вращающихся в изотропной среде, при $5 \cdot 10^{-11}$ с $< \tau_c < 10^{-9}$ с время τ_c находят по формуле

$$\tau_c = 6,65 \Delta H_{+1} (\sqrt{I_{+1}/I_{-1}} - 1) \cdot 10^{-6},$$

где ΔH_{+1} — ширина низкопольного компонента спектра (Гл); I_{+1} , I_{-1} — интенсивности низкопольного и высокопольного компонентов спектра.

В области медленных движений методы определения τ_c основаны на измерении сдвигов линий. Нитроксильная группа $N \rightarrow O$ входит в состав пяти- или шестичленного кольца, которое представляет собой гидрофобную «ножку» метки.

Движение метки и степень его анизотропии будет изменяться при взаимодействии метки с объемными группами белка, с которыми метка сталкивается в пространстве вращения. Так, присоединение радикалов к ϵ -NH₂-группам полилизина сопровождается уменьшением частоты вращения до $\nu = 10^9$ с⁻¹ по сравнению с обратным временем корреляции вращения в воде ($\nu = 4 \cdot 10^{10}$ с⁻¹). Изменение частоты вращения метки (в 10—40 раз) происходит и при нарушении и «разрыхлении» вторичной структуры белков (рис. X.12).

Подобные эффекты удалось обнаружить в процессах образования фермент-субстратных и фермент-ингибиторных комплексов при обработке спин-меченого миозина субстратной смесью (АТФ + Mg²⁺) и при комплексообразовании цианида с миоглобином. Изменения в спектрах ЭПР спиновых меток, расположенных на расстояниях 1—2 нм от активного центра, указывают на распространение аллостерических конформационных перестроек в белковой глобуле. С помощью спин-меток, ковалентно связанных с функциональными группами белка, и гидрофобных спин-зондов, связанных с белком адсорбционными силами, удалось показать, что время τ_c корреляции вращательной диффузии в белках реакционных центров фотосинтеза при увеличении относительной влажности от 0,04 до 0,2 остается постоянным, а затем резко падает (от 10^{-7} с до $5 \cdot 10^{-9}$ с). Это свидетельствует об изменении динамического состояния белка и появлении регистрируемой таким способом молекулярной подвижности. Именно при этих степенях гидратации наблюдается резкий рост функциональной активности, проявляющейся в переносе электрона в реакционных центрах (см. гл. XXVIII). Движение радикала, связанного с белком, складывается из вращения радикала и его переориентации относительно глобулы с временем корреляции τ_c и диффузного вращения макромолекулы белка τ_B относительно среды. Если радикал жестко связан с глобулой, то время корреляции в этом случае отражает τ_B . Когда же спин-метка движется относительно глобулы, то расчет τ_B и τ_c ведут на основе моделирования спектра при разных параметрах анизотропии и значений τ_c , τ_B до совпадения расчетных и экспериментальных данных.

Таким путем удалось показать, что τ_B гемоглобина, сывороточного альбумина соответствуют временам корреляций макромолекул с жесткой структурой и различной степенью эллипсоидальности. Кроме того, τ_B нативных молекул некоторых белков (антитела) незначительно отличается от τ_B их фрагментов, что является следствием относительно свободного вращения последних в соста-

ве молекулы. В целом, скорость вращения нитроксильной метки зависит от глубины ее расположения в слоях белковой глобулы (Г. И. Лихтенштейн).

При локализации метки в наружном водном слое значение τ_c составляет $\sim 10^{-11} \div 10^{-10}$ с (рис. X.13). Поверхностные слои, в которые входят боковые группы белков и вода в «щелях», характеризуются $\tau_c \sim 10^{-10} \div 10^{-8}$ с. В более глубоком слое глобулы, где включены внешние полипептидные цепи, «стисну-

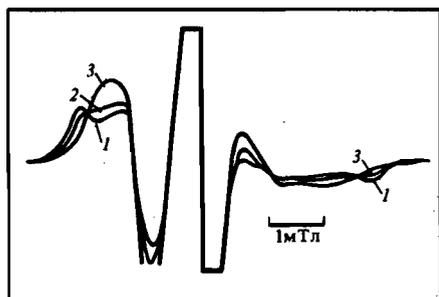


Рис. X.12.

Спектр ЭПР иминкисильного радикала (по Г. И. Лихтенштейну, 1971):

1 — полностью окисленный гемоглобин; 2 — частично оксигенированный гемоглобин; 3 — полностью дезоксигенированный гемоглобин

В случае гемоглобина в растворе конформационные изменения сопровождаются переходом SH-группы на расстояние более 2 нм от геминной группы при посадке на нее кислорода. Это обнаруживается по заметному уширению боковых компонент спектра метки с дополнительным расщеплением в области низкогопольного компонента (h_{+1}) за счет дополнительного торможения вращения иминкисильной группы

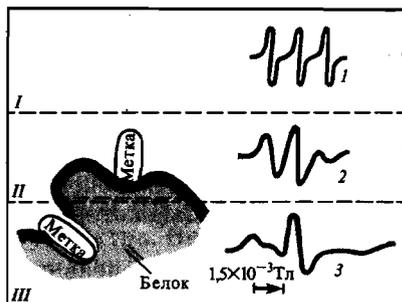


Рис. X.13.

Подвижность различных слоев водно-белковой матрицы (по Г. И. Лихтенштейну, 1974):

I — внешний водный слой матрицы ($\nu \approx 10^{11} - 10^{10}$), II — глицириноподобный слой матрицы ($\nu \approx 10^{10} - 10^8$); III — относительно твердый слой матрицы ($\nu \approx 10^8 - 10^7$); ν — частота корреляций вращательной диффузии радикалов (с^{-1});

1, 2, 3 — типичные спектры ЭПР иминкисильных радикалов, погруженных в соответствующие слои матрицы

тые» боковые группы и прочносвязанная вода, τ_c повышается до $10^{-8} - 10^{-7}$ с. Это ясно свидетельствует о замедлении скорости вращения метки по мере ее погружения, что соответствует существованию более плотного ядра глобулы по сравнению с рыхлой «опушкой» (см. § 2 гл. VII). В целом времена корреляции, поддающиеся определению методом спиновых меток, находятся в диапазоне 0,1—300 нс, хотя в последние годы интенсивно развиваются методы, позволяющие определять τ_c спиновых меток до $10^{-3} - 10^{-4}$ с. Исследование биоструктур, включая белки и мембраны (см. ниже), с помощью спин-меток дает важную информацию о молекулярной динамике, особенно в сочетании с другими методами.

Метод ядерного магнитного резонанса

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР). Одним из мощных методов изучения динамики биополимеров является метод ядерного магнитного резонанса. Сущность явления ЯМР сходна в основных чертах с электронным парамагнитным резонансом. Ядра, спины которых отличаются от нуля, обладают магнитным

дипольным моментом и ориентируются во внешнем постоянном магнитном поле H_0 . В случае спина ядра, равного $s=1/2$, это дает расщепление исходного уровня на два подуровня соответственно (рис. X.14).

Условия резонанса при наложении переменного поля имеют вид (ср. (X.2.16))

$$h\nu_N = g_N \beta_N H_0, \quad (\text{X.2.23})$$

где g_N — ядерный g -фактор; $\beta_N = e\hbar/(2m_p c)$ — ядерный магнетон; m_p — масса протона, составляющая $1836m_e$. Для протона $g_H = 5,58$, а ядерный магнетон $\beta_N = 0,505 \cdot 10^{-26}$ Дж/Тл. Соответственно при $H_0 = 1$ Тл резонансная частота для протонного ядерного резонанса составит $\nu_H = 4,26 \cdot 10^7$ с $^{-1}$, что соответствует диапазону метровых радиоволн и намного меньше резонансной частоты ν_e для электрона. Условия резонанса для ядер, например протонов, входящих в состав молекул, будут отличаться от условий для свободного протона вследствие экранирования электронными оболочками и влияния ядер химического окружения протона. Поэтому резонансное магнитное поле в (X.2.23) должно быть заменено эффективным полем, учитывающим влияние окружения. Кроме того, магнитные моменты различных ядер взаимодействуют между собой и электронами в молекуле, причем характер этого взаимодействия также зависит от окружения ядра. Эти факторы влияют на параметры спектра ЯМР, давая тем самым информацию о химических свойствах и внутримолекулярной динамике образца.

Химический сдвиг. Влияние локальных полей соседних ядер вызывает изменение положения полосы резонанса для протонов (и других ядер), занимающих различное место в структуре молекулы. Этот сдвиг называется химическим сдвигом, его величина пропорциональна приложенному постоянному магнитному полю. Физическая причина сдвига заключается в том, что во внешнем магнитном поле индуцируются циркуляция электронов и соответствующие электронные токи в молекуле. Направление этих электронных токов таково, что индуцированное ими дополнительное магнитное поле $H_{\text{инд}}$ на ядрах по величине пропорционально, а по направлению противоположно (в силу закона Ленца) внешнему полю H_0 ($H_{\text{инд}} = \sigma H_0$). Поэтому полное эффективное магнитное поле, которое действует на данный ядерный момент, имеет вид

$$H_{\text{эфф}} = H_0 - H_{\text{инд}} = (1 - \sigma)H_0, \quad (\text{X.2.24})$$

где σ — так называемая постоянная экранирования (безразмерная величина), по порядку равная 10^{-6} . Величина σ анизотропна, однако в жидкостях она усредняется. С учетом (X.2.24) условие резонанса выглядит следующим образом:

$$h\nu_N = g_N \beta_N (1 - \sigma)H_0.$$

Следовательно, резонанс теперь будет наблюдаться на другой частоте.

Рассмотрим два протона i и j с различными химическими окружениями и, следовательно, с разными константами экранирования σ_i и σ_j . Можно измерить относительный химический сдвиг в спектрах их ЯМР, обусловленный их различным местоположением в химической структуре:

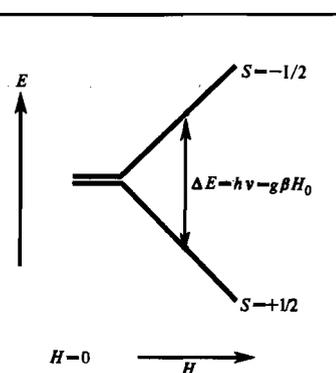


Рис. X.14. Условия резонанса ядерного спина при наличии внешнего магнитного поля (расщепление энергетических уровней ядра со спином $1/2$)

$$\nu = \nu_i - \nu_j = g_N \beta_N H_0 (-\sigma_i + \sigma_j) = \nu_0 (\sigma_j - \sigma_i),$$

или $\Delta\nu = \nu_0 \Delta\sigma$, где $\Delta\nu$ — разница резонансных частот i -го и j -го протонов, а $\Delta\sigma$ — разница в константах экранирования этих же протонов.

Химические сдвиги обычно измеряют относительно некоторой эталонной линии стандартного инертного соединения (тетраметилсилан $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ для органических веществ, производное сульфоновой кислоты для водных растворов биополимеров). Химические сдвиги выражают в безразмерных единицах — миллионных долях (м. д.): $\delta(\text{м. д.}) = (\Delta\nu/\nu_0) 10^6 = (\Delta H/H_0) 10^6$, где $\Delta\nu$ (или ΔH) — разница в положении исследуемой линии и линии эталона; ν_0 — рабочая частота спектрометра; H_0 — приложенное к образцу поле. У биополимеров величины сдвигов варьируют для алифатических протонов от $-0,5$ до $-2,0$ м. д.

Сверхтонкая структура (СТС) в спектрах ЯМР. Другая особенность спектров ЯМР — расщепление спектральных линий, обусловленное присутствием других ядер, обладающих собственным магнитным моментом, вследствие их взаимного влияния, передающегося через электронные связи. В результате спин-спинового взаимодействия ядер появляется СТС спектра ЯМР, аналогичная СТС в случае ЭПР. На первой стадии спин-спинового взаимодействия ядро возмущает валентные электроны, которые ориентируются в результате этого воздействия, поляризуя определенным образом свои спины.

Электронная спиновая поляризация передается через химическую связь на второе ядро с образованием у него избытка электронов, ориентированных в соответственном спиновом состоянии. В результате у второго ядра ориентация спина коррелирует с ориентацией спина первого ядра-индуктора.

Величина сверхтонкого расщепления в спектре ЯМР не зависит от величины внешнего магнитного поля в отличие от химического сдвига. На рис. X.15 приведен спектр ЯМР ацетальдегида $\text{CH}_3\text{—CHO}$, на котором видны разделенные химическим сдвигом две группы линий разной интенсивности, обусловленные тремя протонами метильной и одним протоном альдегидной групп соответственно. Расщепление каждой из этих групп на отдельные линии образует СТС вследствие спин-спинового взаимодействия. Так, расщепление линии метильных протонов на два компонента равной интенсивности соответствует двум возможным ориентациям спина альдегидного протона.

Изучение спектров ЯМР белковых молекул. До недавнего времени использовали лишь спектры ЯМР протонов, дающих более интенсивные сигналы по сравнению с ядрами изотопов ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P . Вследствие перекрывания основной массы резонансных линий от протонов на фоне неразрешенной структуры удается выделить лишь относительно небольшое число линий. Это можно преодолеть за счет повышения разрешения, а также расширения спектра, если увеличивать резонансную частоту для протонов до 270—360 МГц и подавлять спин-спиновое взаимодействие дополнительным радиочастотным облучением на резонансной частоте для ядер, взаимодействующих с ядрами исследуемых групп. В результате становится возможным анализ спектров ЯМР для отдельных сравнительно небольших белков с выделением линий от метильных, метиленовых, SH-групп, остатков триптофана, тирозина, гистидина.

Наблюдение резонанса ^{13}C , линии которого находятся в стороне от основной массы неразрешенных резонансных линий, позволяет определять отдельные линии карбонильных групп, остатков аргинина, аланина. В последнее время широкое распространение получают исследования спектров ЯМР от ^{31}P на живых клетках, которые используют, в частности, для изучения строения мембран (см. гл. XV, XVI).

Изучение динамики белковых структур методом ЯМР. Оно основано на измерении времен спин-решеточной T_1 и спин-спиновой T_2 релаксации магнит-

ных моментов ядер и зависимости этих времен от характерного времени корреляции τ_c движения.

Физический смысл времен T_1 и T_2 был рассмотрен ранее (см. (X.2.21)). Причиной, определяющей ядерную релаксацию, является движение молекул, в состав которых входят резонирующие ядра. Переменные магнитные поля,

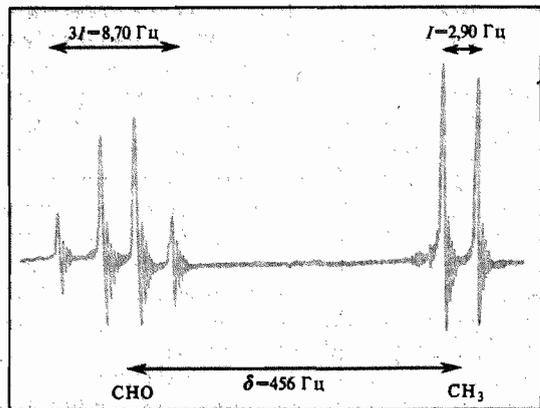


Рис. X.15. Спектр ЯМР ацетальдегида CH_3CHO (по А. Керрингтону, Э. Мак-Лечлану, 1970): I — величина сверхтонкого расщепления; магнитное поле увеличивается слева направо

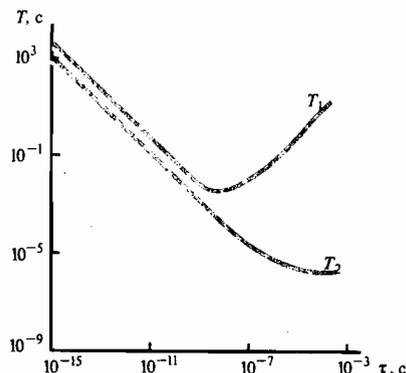


Рис. X.16. Теоретическая зависимость времен спин-решеточной (T_1) и спин-спиновой (T_2) релаксации от времени корреляции τ (зависимость рассчитана для протонов на резонансной частоте (X.2.24) (по А. Керрингтону, Э. Мак-Лечлану, 1970)

возникающие при молекулярных движениях, вызывают переходы между различными спиновыми состояниями, и благодаря этому спиновая система достигает равновесия. В этом отношении весьма существенно время, характеризующее молекулярное движение. Любое взаимодействие, индуцирующее переходы между спиновыми состояниями и сильно флуктуирующее с частотой, совпадающей с частотой резонанса ($\omega_0 \sim 10^7$ Гц для ядер H^+), создает сильную спин-решеточную релаксацию и уширение линии. Хаотические изменения положения энергетических уровней спинов, не вызывающие переходов между ними, не влияют на T_1 , но дают вклад в ширину линий $1/T_2$ (см. (X.2.21)).

Для простого случая двух взаимодействующих протонов, которые расположены на расстоянии r друг от друга и вращаются изотропно, справедливы следующие зависимости T_1 и T_2 от частоты резонанса ω_0 и времен корреляции τ_c вращательного движения молекулярной группировки, включающей рассматриваемые протоны:

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

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{5} \frac{\gamma^4 \hbar^2 I(I+1)}{r^6} \left[\frac{5\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} + 3\tau_c + \frac{2\tau_c}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} \right], \quad (\text{X.2.25})$$

где γ — гиромагнитное отношение для протонов: I — спин ядра. Зависимости T_1 и T_2 от времени корреляции τ_c , рассчитанные из уравнений (X.2.25), можно представить графически (рис. X.16).

Для воды при комнатной температуре $\tau_c \sim 2,7 \cdot 10^{-12}$ с. В обычных спектрометрах протонного резонанса при частоте резонанса 60 МГц ω_0 равно $1,9 \cdot 10^8$ рад/с. Отсюда видно, что $\omega_0 \tau_c$ мало, и в (X.2.25) этой величиной можно пренебречь. Тогда для жидкости $T_1 \sim T_2$. При $\tau_c = 2,7 \cdot 10^{-12}$ с, $r = 0,158$ нм находим $T_1 = 6,7$ с. Из (X.2.25) видно, что T_2 линейно растет ($T_2 \sim 1/\tau_c$) при уменьшении времени корреляции τ_c от 10^{-5} с (твердое тело, жесткая решетка) до 10^{-12} с (жидкость).

Увеличение T_2 с ростом молекулярной подвижности есть результат усреднения влияния разных локальных полей на спины резонирующих ядер и, как следствие, приводит к увеличению времени T_2 их существования в данном спиновом состоянии. Такая же зависимость наблюдается и для T_1 в диапазоне значений от $\tau_c \sim 10^{-12}$ с до $\tau_c \sim 1/\omega_0$. В этой области при малых τ_c T_1 , как и T_2 , пропорционально $1/\tau_c$. Однако при больших значениях τ_c ($\tau_c \gg 1/\omega_0$), кривые для T_1 и T_2 расходятся. В области $\tau_c = 1/\omega_0$ кривая для T_1 достигает минимума, после чего T_1 при больших временах релаксации становится пропорциональным τ_c , а не $1/\tau_c$ и начинает снова возрастать.

Падение T_1 при росте τ_c в процессе перехода от жидкости к твердому телу происходит за счет изменения спектра колебаний решетки и увеличения в нем доли колебаний с частотами, совпадающими с частотой резонанса ω_0 . Рост τ_c после достижения минимума T_1 при $\omega_0 \tau_c = 1$ связан с дальнейшим изменением спектра колебаний, уменьшением доли резонансных колебаний (ω_0) в решетке твердого тела и соответственно уменьшением спин-решеточной релаксации и ростом T_1 . Таким образом, минимум на кривой T_1 соответствует наличию в спектре времен релаксаций τ_c таких молекулярных движений, для которых значения $1/\tau_c$ совпадают с резонансной частотой ω_0 .

Определение времен релаксации отдельных молекулярных групп белка по ширине полос спектров ЯМР ограничено возможностями разрешения полос резонанса. В настоящее время существуют сведения о внутренних движениях отдельных участков, полученных таким образом. Так, изучение спектров высокого разрешения лизоцима и трипсина показало, что оба (пара- и мета-) протона каждого остатка тирозина имеют тем не менее одинаковые химические сдвиги. Это может указывать на вращение тирозиновых колец относительно пептидного остова со средними скоростями не ниже 10^4 с⁻¹.

В некоторых случаях удается активировать при повышении температуры обычно заторможенное движение остатков тирозина и фенилаланина. При этом спектр, характерный для медленного обмена, вначале уширяется, а затем при дальнейшем повышении температуры сужается и становится характерным для условий быстрого обмена между конформациями с разными ориентациями ароматического кольца. Определение T_1 по релаксации ¹³C показало, что τ_c составляет для миоглобина 22 нс, лизоцима — 13 нс, гемоглобина — 47 нс. В этих случаях спин-решеточная релаксация определяется броуновским вращением всей макромолекулы в целом. Намного большие значения времени спин-решеточной релаксации имеют узкие резонансы углеводовородов алифатических боковых цепей на поверхности белка. В случае рибонуклеазы для C^β, C^γ, C^δ и C^ε значения τ_c соответственно равны 0,3; 0,2; 0,15; 0,08 нс. Это явно указывает на большую подвижность поверхностных слоев относительно белковой глобулы с частотами, превышающими частоту броуновского вращения глобулы. Однако форму и ширину отдельных линий определить трудно вследствие их перекрывания в сложных спектрах биополимеров.

Импульсный метод ЯМР. Метод спинового эха дает уникальную информа-

цию о движении внутренних слоев белка. Он основан на том, что система спинов, ориентированных в постоянном внешнем магнитном поле, возбуждается импульсом радиочастотного поля и выводится тем самым из равновесия. Это приводит к отклонению вектора микроскопической намагниченности от его первоначальной ориентации вдоль направления поля H_0 . После окончания радиочастотного импульса нарушенное равновесие в системе спинов восстанавливается, а вектор микроскопической намагниченности вновь возвращается к первоначальной ориентации с восстановлением так называемой продольной намагниченности. Избыток энергии при этом отдается решетке с характерным временем T_1 спин-решеточной релаксации.

Другой процесс, связанный с установлением равновесной намагниченности, называется поперечной или спин-спиновой релаксацией. В ходе этого процесса теряется когерентность в движении отдельных спинов, что сопровождается спадом поперечной намагниченности с характерным временем T_2 . Малые времена T_2 соответствуют быстро спадающим компонентам сигнала спин-эха и означают быструю потерю когерентности движения ядерных спинов вследствие влияния на них локальных магнитных неоднородностей. Этот случай соответствует резонансу от ядер, принадлежащих малоподвижным относительно жестко закрепленным молекулярным группам, где усреднение влияния локальных полей не успевает произойти за время ($\sim 1/\omega_0$), обратное частоте резонанса. Наоборот, большие T_2 и медленно спадающие компоненты сигнала спинового эха характеризуют динамику подвижных областей образца. Измеряемые времена релаксации для протонов или других ядер непосредственно связаны с частотами движения самих молекулярных групп или движения макромолекулы в целом. На величину T_2 влияют только движения, связанные с изменением среднего расстояния между взаимодействующими ядрами (протонами). Метод спин-эха, не требующий введения каких-либо посторонних меток, позволяет оценивать и распределение отдельных видов движения в макромолекулярной структуре.

Исследования показали, что величина T_1 для протонов белка зависит и от вращения белковой глобулы в целом, и от внутреннего движения. Так, увеличение молекулярной массы белка и замедление вращательного диффузионного движения приводят к ограниченному росту значений T_1 с достижением предельных значений порядка 150 мс. Время спин-решеточной релаксации белков уменьшается при увеличении температуры в интервале от 0 до 40 °С. Поскольку времена корреляции τ_c внутримолекулярных движений уменьшаются с ростом температуры, это однозначно свидетельствует о том, что обнаруженная температурная зависимость T_1 соответствует правой части кривой зависимости T_1 от τ_c на рис. X.16. Здесь выполняются условия $T_1 > T_2$ и $\omega_0 \tau_c > 1$, где ω_0 — частота резонанса, равная 10^8 с^{-1} .

Определение непосредственного вклада внутримолекулярных движений в спин-решеточную релаксацию проводили путем изучения температурной зависимости концентрированных вязких растворов белков, где диффузионное движение макромолекул достаточно замедленно ($\omega_0 \tau_c \gg 1$), так что оно уже не влияет на T_1 (С. И. Аксенов).

Оказалось, что температурные зависимости времени спин-решеточной релаксации протонов белка (сывороточный альбумин) обладают двумя минимумами: около -100 °С и около 0 °С (рис. X.17). В области низкотемпературного минимума, где $T_1 \approx 90$ мс, из соотношения (X.2.25) при значении постоянного множителя $9,7 \cdot 10^8 \text{ с}^{-2}$ можно найти величину τ_c . Считая, что время корреляции экспоненциально зависит от температуры $\tau_c = \tau_0 \exp[E_{\text{акт}}/(RT)]$, находим $E_{\text{акт}} = 10,5 \text{ кДж/моль}$, $\tau_0 = 2,9 \cdot 10^{-12} \text{ с}$. При комнатной температуре $\tau_c = 2,2 \times 10^{-10} \text{ с}$. Это хорошо соответствует значениям τ_0 и $E_{\text{акт}}$, полученным для вра-

шения метильных групп в порошках полиаланина, поливалина и полилейцина. Другой минимум около 0°C , зависящий от оводненности белка, соответствует движению протонов с временем корреляции 10^{-8} с, что связано с более медленными видами движения (возможно, осцилляции полипептидной цепи на углы до 30°).

В отличие от кривых восстановления продольной намагниченности (T_1), близких к одноэкспоненциальным, кривые спада сигнала спин-эха поперечной намагниченности от протонов обладают сложным многокомпонентным характером. Они отчетливо разделяются на три компонента: быстроспадающий, обусловленный в основном вращением CH_2 -групп в составе глобулы как целого; промежуточный, соответствующий протонам подвижных метильных групп и протонам CH - и ароматических групп, находящихся на относительно больших расстояниях друг от друга (в данном случае частоты их вращения ниже частот вращения глобулы); медленно спадающий, характерный для движения внешних наиболее подвижных групп белка (рис. X.18).

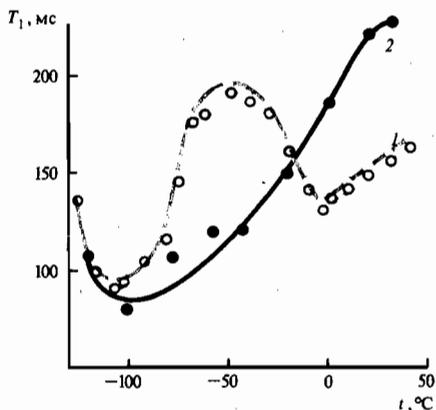


Рис. X.17. Температурная зависимость времени спин-релаксации протонов сыровороточного альбумина человека (по С. И. Аксенову, 1978): 1—50%-ный раствор белка в D_2O ; 2—лиофилизированный из D_2O порошок белка

Значения времен корреляции вращательного движения для нескольких углеродных атомов паралабумина составляли около $\sim 10^{-8}$ с и также соответствовали более высокой подвижности периферических аминокислотных остатков по сравнению с внутренними.

Времена T_1 и T_2 отвечают движениям с разными частотами и, в частности, поворотом субъединиц белка относительно друг друга на углы до 30° . Эти движения эффективно влияют лишь на спин-решеточную релаксацию, но для воздействия на T_2 требуется полный поворот межъядерного вектора — расстояния, что достигается только при вращении всего белка в целом. Таким образом, метод ЯМР позволяет идентифицировать определенные виды внутримолекулярного движения в молекуле белка. Все это дает возможность осуществлять прямые экспериментальные исследования связи между внутренней динамикой и функцией белковых молекул.

Метод гамма-резонансной спектроскопии

Физические основы метода. Этот метод также дает важную информацию о динамике белков. Он позволяет определять амплитуды смещений атомов в структуре белка на коротких временах (10^{-7} — 10^{-9} с). Он основан на том, что при поглощении γ -кванта происходит переход ядра из основного (E_1) в возбужденное состояние (E_2) согласно обычному закону $\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu$, где для ядерных уровней ΔE составляет 10^3 — 10^5 эВ. Поглощение γ -квантов наблюдается на ядрах тяжелых атомов Fe, Cu, Pb. Для изотопа ^{57}Fe , содержащегося в природных соединениях в количестве 2,2%, величина ΔE при резонансном поглощении составляет 0,0144 МэВ, а время жизни ядра ^{57}Fe в возбужденном состоянии $\tau^* \sim 10^{-7}$ с. Отсюда согласно соотношению неопре-

деленностей для энергии (X.2.20) можно найти, что естественная ширина резонансной линии поглощения γ -квантов составляет очень малую величину $\Gamma \sim 10^{-8}$ эВ.

Пусть время корреляции (τ_c) ненаправленного движения ядра в образце близко или меньше времени жизни его возбужденного состояния ($\tau_c \sim \tau^* \sim 10^{-7}$ с). Тогда в силу закона сохранения импульса при поглощении γ -кванта может произойти передача части энергии кванта в поступательное движение

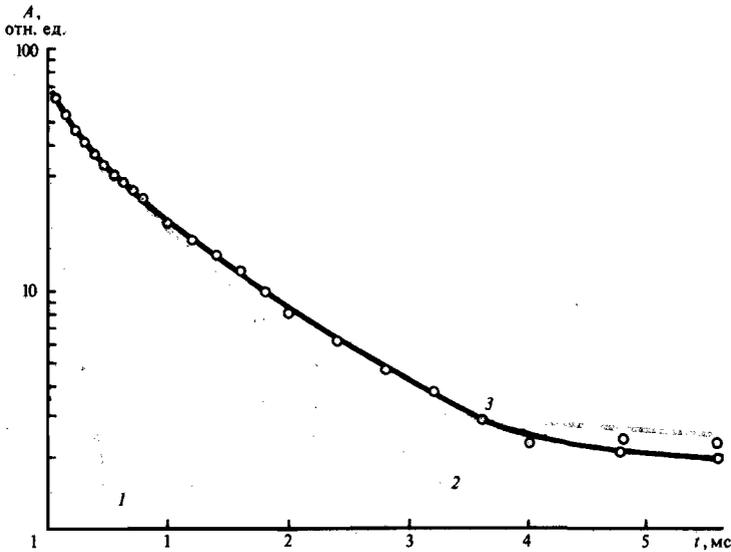


Рис. X.18.

Кривая спада поперечной намагниченности протонов иммуноглобулина (4,5%-ный раствор в D_2O) и ее разложение на компоненты (по С. И. Аксенову, 1978):

С — суммарная кривая спада; М — медленный компонент; П — промежуточный компонент, полученный после вычитания медленного компонента из суммарной кривой; Б — быстрый компонент, полученный после вычитания медленного и промежуточного компонента из суммарной кривой

Б обусловлен вращением глобулы как целого; П соответствует относительно медленным внутренним движениям; М характеризует движение внешних, наиболее подвижных групп белка

мёссбауэровского ядра. Следовательно, энергия γ -кванта, используемая для внутреннего возбуждения ядра, будет уменьшена на величину, равную энергии отдачи, а резонансная частота поглощения ν_γ теперь будет определяться соотношением

$$h\nu_\gamma = \Delta E - mv^2/2, \quad (X.2.26)$$

где $\Delta E = E_2 - E_1$ (равно 0,0144 МэВ для ^{57}Fe); m — масса мёссбауэровского ядра; v — скорость отдачи. Энергия отдачи ($E_{\text{отд}} = mv^2/2$) для свободного ядра ^{57}Fe составляет величину $\sim 0,002$ эВ, которая и определяет небольшое изменение частоты поглощенного γ -кванта. Так как естественная ширина линии $\Gamma \ll E_{\text{отд}}$, то сдвиг частоты поглощения ν_γ очень заметен.

На практике образец облучают γ -лучами, испускаемыми радиоактивным источником, в котором генерируются возбужденные ядра ^{57}Fe . Сообщая источнику небольшую скорость $\pm(0,1-10)$ см/с движения относительно образца вдоль соединяющей их оси и изменяя таким образом частоту излучения за счет эффекта Доплера, снимают спектры поглощения γ -квантов (рис. X.19). Различ-

ные скорости источника соответствуют разным энергиям отдачи, разброс значений которых отражает статистическое распределение числа атомов в образце по соответствующим скоростям.

Спектры ЯГР (ядерного гамма-резонанса), отражают химическую и физическую структуру окружения ядра и характеризуются химическим сдвигом, квадрупольным расщеплением, формой линий и сверхтонкой структурой. В на-

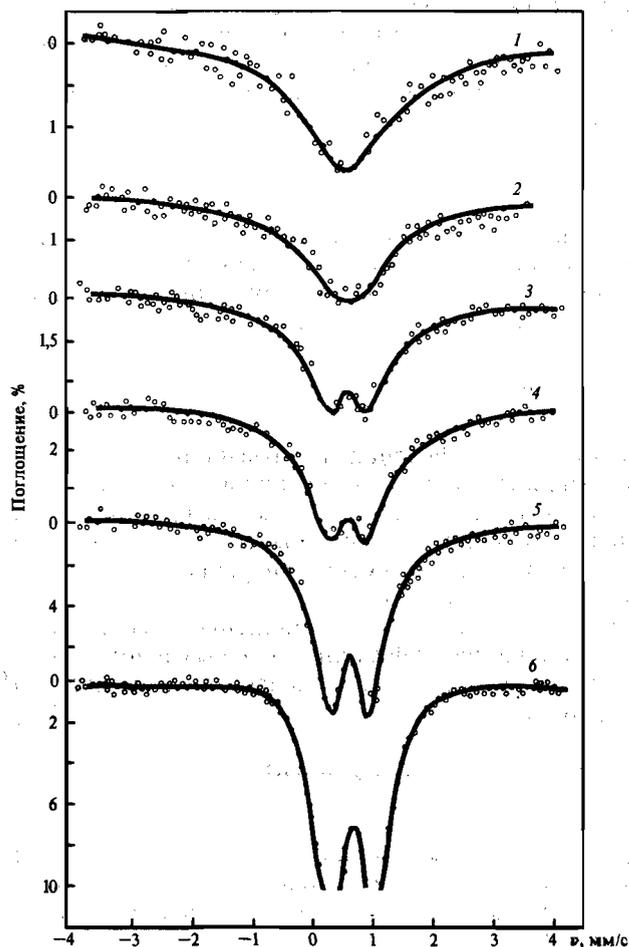


Рис. X.19.
Мёссбауэровские спектры модифицированного ^{57}Fe сывороточного альбумина человека (в водном растворе глицерина, 100 мг/мл) (по Г. И. Лихтенштейну, 1974):

1—6—температура, равная 13,5; —4; —11; —22; —190; —196 °С соответственно

Уширение спектра обусловлено диффузией молекул белков. Изменение частоты уширения пропорционально скорости источника (v)

стоящее время ЯГР становится мощным орудием в расшифровке атомной структуры активных центров.

Эффект Мёссбауэра. Основной источник информации о динамической структуре белков заключается в изучении относительного уширения спектра ЯГР и вероятности (f') резонансного поглощения γ -квантов без отдачи (максимум линии поглощения, рис. X.19). В твердом теле поглощение без отдачи означает, что импульс отдачи принимает на себя весь кристалл в целом, обладающий большой массой M . В этом случае энергия отдачи кристалла в M/m раз меньше, чем энергия отдачи одиночного ядра, т. е. пренебрежимо мала и

намного меньше естественной ширины Γ . Иными словами, в спектрах появляются линии, не смещенные по энергии из-за отсутствия отдачи. Возбуждения колебаний отдельных атомов (фононов) в решетке не происходит, а импульс отдачи воспринимается всем кристаллом в целом. В этом, в сущности, и состоит эффект Мёссбауэра.

С ростом среднеквадратичного смещения $\langle x^2 \rangle$ мёссбауэровского ядра вероятность поглощения γ -кванта без отдачи f' падает. Наоборот, величина f' стремится к единице, когда $\langle x^2 \rangle$ мало по сравнению с λ — длиной волны γ -кванта. Случай малых $\langle x^2 \rangle$ соответствует жесткой связи атомов в решетке и соответственно большой величине колебательного кванта, которая существенно превосходит энергию отдачи. В этих условиях передачи энергии ядру не происходит. Зависимость f' от $\langle x^2 \rangle$ в случае твердых тел выражается формулой Дебая—Валлера (Лэмба—Мёссбауэра)

$$f' = e^{-\langle x^2 \rangle / \lambda^2}, \quad (\text{X.2.27})$$

где $\lambda = \lambda / (2\pi)$; λ — длина волны γ -кванта ($\lambda = 0,013$ нм для ^{57}Fe). Это соотношение справедливо, когда время релаксации ядра достаточно мало: $\tau_c \ll \tau^*$.

В твердых телах само движение мёссбауэровского атома обычно моделируется гармоническим осциллятором с малым затуханием

$$\langle [x(t)]^2 \rangle = \langle x_a^2 \rangle (1 - e^{-\gamma t / (2m)} \cos(\omega_0 t)), \quad (\text{X.2.28})$$

где x_a — амплитуда; ω_0 — частота; γ — эффективный коэффициент трения; m — масса осциллятора. Условие малости затухания состоит в $\gamma / m \ll \omega_0$. Важно подчеркнуть, что уменьшение вероятности f' при росте $\langle x^2 \rangle$ в твердых телах происходит без уширения линии поглощения при условии малости смещений атомов с сохранением их положений в узлах решетки. Энергию отдачи с вероятностью f' берет на себя весь кристалл в целом.

В противоположность твердому телу в жидкостях смещение мёссбауэровского атома носит характер неограниченной диффузии. Это вызывает доплеровское уширение линии, величина которого определяется выражением

$$\Delta\Gamma = 2k^2 D, \quad (\text{X.2.29})$$

где $k = 2\pi/\lambda$ — волновое число γ -кванта; D — коэффициент диффузии, равный

$$D = k_B T / (6\pi\eta a) \quad (\text{X.2.30})$$

(k_B — константа Больцмана; η — вязкость; a — радиус частицы). Здесь за время τ^* в результате диффузии успевает произойти передача части энергии γ -кванта окружающей среде, что приводит одновременно к уширению линии и падению вероятности поглощения без отдачи f' :

$$f' = \Gamma / (\Gamma + \Delta\Gamma). \quad (\text{X.2.31})$$

Среднеквадратичное смещение ядра за время t в жидкости пропорционально коэффициенту диффузии:

$$\langle [x(t)]^2 \rangle \sim 2Dt. \quad (\text{X.2.32})$$

В общем случае ядро может участвовать одновременно в нескольких независимых движениях, включающих колебания атомов по химическим связям, колебания участка системы, с которым прочно связано мёссбауэровское ядро, диффузионное перемещение макромолекулы как целого. Если эти виды движения не зависят друг от друга, то общее смещение ядра $\langle x_{\text{общ}}^2 \rangle$ склады-

вается из локальных внутримолекулярных смещений $\langle x_{\text{лок}}^2 \rangle$ и общего диффузионного смещения всей частицы $\langle x_{\text{диф}}^2 \rangle$, в которой находится мёссбауэровский атом:

$$\langle x_{\text{обш}}^2 \rangle = \langle x_{\text{лок}}^2 \rangle + \langle x_{\text{диф}}^2 \rangle.$$

В свою очередь, локальные смещения могут включать колебания ядер и смещения, связанные с переходами между различными конформационными подстояниями (см. § 1 гл. IX):

$$\langle x_{\text{лок}}^2 \rangle = \langle x_{\text{кол}}^2 \rangle + \langle x_{\text{конф}}^2 \rangle.$$

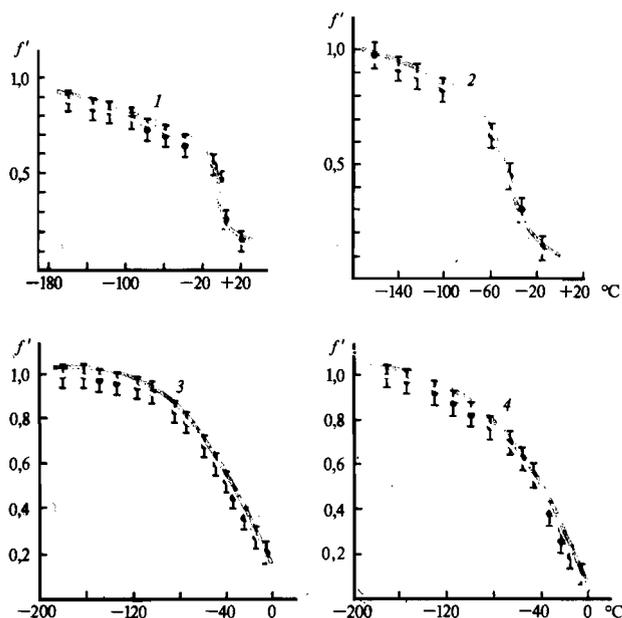


Рис. X.20.
Зависимость $f'(T)$ для порошков (по Е. Н. Фролову, 1985):
1—коллагена при степени гидратации $P/P_s=0,97$, 2—лизоцима при степени гидратации $h=0,16$ г $\text{H}_2\text{O}/\text{г}$ белка, 3, 4—для α -химотрипсина сывороточного альбумина человека при степени гидратации $P/P_s=0,95$ соответственно

В тех случаях, когда в основном реализуется подвижность частиц как целого, падение f' всегда сопровождается уширением линии поглощения, как в случае жидкости. Наоборот, в системах, где смещение обусловлено внутримолекулярными движениями с малыми амплитудами целого участка с прочно фиксированным в нем мёссбауэровским ядром, падение f' не сопровождается уширением. Оно скорее отражает уменьшение связи этого участка с остальной системой (кристаллом), например из-за уменьшения вязкости в процессе локального плавления. Это приводит к тому, что падение вероятности для кристалла в целом взять на себя импульс отдачи не сопровождается уширением линии. В модельных системах это явление наблюдается, например, в «рыхлых» частицах оловянных кислот, обладающих внутренней динамикой. Смещения мёссбауэровского атома зависят от внешних условий и могут увеличиваться с повышением температуры или уменьшением вязкости системы. Так, плавление твердых тел всегда связано с резким уширением спектра и исчезновением мёссбауэровской линии.

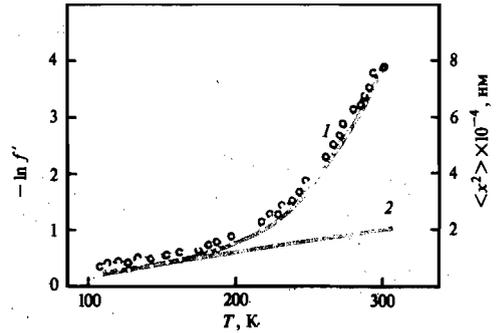
Температурные зависимости f' и ΔG . Их изучение дает информацию о характере подвижности мёссбауэровских ядер и свойствах их окружения. Важнейшее преимущество данного метода заключается в возможности определять также и амплитуды движений атомов. В этом состоит его отличие от других

резонансных методов, где определяются лишь частотные характеристики движений. На рис. X.20 приведены кривые температурной зависимости $f'(T)$ для препаратов белков, меченных изотопом ^{57}Fe . Для увлажненных белков вероятность эффекта f' слабо меняется в области низких температур, однако резко падает при температурах, превышающих $-(60-30)^\circ\text{C}$, без уширения ГР-линии. Уширение мёссбауэровских спектров наблюдается только при температурах выше -20°C на конечных участках кривой $f'(T)$, где вероятность эффекта уже мала (см. рис. X.19). Сухой белок характеризуется слабой температурной за-

Рис. X.21.

Температурная зависимость эффективного среднеквадратичного смещения ядер ^{57}Fe для метмиоглобина (Met Mb) (по Bauminger et al., 1983):

1 — MetMb, 2 — $\langle x^2 \rangle \nu$;
 $\langle x^2 \rangle \sim -k^2 \ln f'$;
 $\langle x^2 \rangle = \langle x^2 \rangle_c + \langle x^2 \rangle_v$;
 $\langle x^2 \rangle_c$ — вклад конформационных степеней свободы, $\langle x^2 \rangle_v$ — вклад колебаний ядра ($\langle x^2 \rangle_v = k_B T / K$; K — константа жесткости для колебаний атома ^{57}Fe)



висимостью фактора f' и постоянной шириной ГР-линии, что характерно для колебаний ионов ^{57}Fe в твердой матрице. Зависимость f' от относительной влажности образца (P/P_s) носит пороговый характер, что свидетельствует о кооперативном характере конформационной подвижности водно-белкового комплекса при степени гидратации $P/P_s \geq 0,4$ (см. § 4 гл. IX).

Таким образом, гидратированные белки при температурах 77—200 К не отличаются по своей динамике от твердых тел. Мёссбауэровские ядра совершают в этих условиях высокочастотные колебания с малой амплитудой $A < 0,01$ нм: В диапазоне температур 200—260 К растормаживается движение со средней частотой $\omega > 10^7 \text{ с}^{-1}$ и амплитудой смещений $A \sim 0,03 \div 0,06$ нм, а также наблюдается небольшое уширение ГР-линий. Следовательно, белок отличается по своему динамическому поведению как от твердых тел, так и от жидкостей. Температурная зависимость $f'(T)$ и увеличение эффективного значения $\langle x^2 \rangle$ с ростом T для белка имеют довольно резкий излом (рис. X.21, 1), что нехарактерно для колебаний атомов в твердых телах (рис. X.21, 2). Кроме того, в этом случае при повышении температуры в отличие от жидкостей не происходит большого уширения ГР-линии. Последнее обстоятельство напоминает свойства твердотельной матрицы.

Изменение во времени смещения ядра $\langle [x(t)]^2 \rangle$ в белках отличается от такового для твердого тела (X.2.28) и жидкости (X.2.31) и имеет вид

$$\langle [x(t)]^2 \rangle = \langle x_a^2 \rangle (1 - e^{-t/\tau_c}), \tag{X.2.33}$$

где $\tau_c = \tau_c^0 e^{\varepsilon/(k_B T)}$; τ_c и ε — время корреляции и энергия активации движения мёссбауэровского ядра;

$$\sqrt{\langle x^2 \rangle} = 0,1 \text{ нм.}$$

На рис. X.22 представлены графики характерных зависимостей смещения мёссбауэровского ядра от времени в твердом теле (X.28), жидкости (X.2.32) и белке (X.2.33). Видно, что на коротких временах динамика смещения ядра

атома в белке напоминает диффузию в жидкости. Однако в белке диффузия носит ограниченный характер, поскольку среднеквадратичное смещение $\langle [x(t)]^2 \rangle$ не превышает некоторых предельных значений, что аналогично смещению в твердом теле. Временное разрешение в ГР-спектроскопии лимитируется временем возбужденного состояния τ^* ядра ($\sim 10^{-7}$ с для ^{57}Fe). Рекорд-

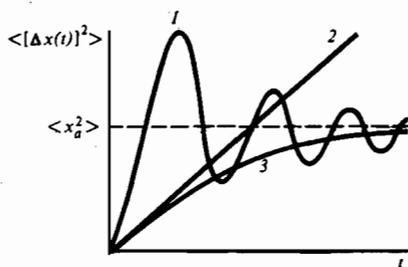


Рис. X.22.

Характер зависимостей для колебаний смещения мёссбауэровского ядра от времени (по К. В. Шайтану, 1982):

1—колебания атомов в кристалле, 2—диффузия в жидкости, 3—конформационные движения в белке

ное энергетическое разрешение ($\sim 10^{-9}$ Эв) позволяет измерять времена корреляции от 10^{-6} до 10^{-8} с. Вклад в вероятность эффекта дают все движения со средними частотами больше 10^6 с $^{-1}$.

Пусть при некоей характеристической температуре T_k время перехода ядра $\tau_k(T_k)$ между конформационными подсостояниями совпадает с τ^* , т. е. $\tau_k(T_k) = \tau^*$. Очевидно, при $T \ll T_k$, τ_k намного больше τ^* и метод ГР-спектроскопии будет чувствителен только к смещениям ядер в процессе их колебаний: $\langle x^2 \rangle_{T \ll T_k} = \langle x_{\text{кол}}^2 \rangle$.

Наоборот, при $T \gg T_k$ τ_k становится короче τ^* и в общем смещение ядра за время τ^* успевают дать вклад переходы между конформационными подсостояниями $\langle x_{\text{конф}}^2 \rangle$ и диффузия $\langle x_{\text{диф}}^2 \rangle$. В белках обычно можно принять, что $\langle x_{\text{диф}}^2 \rangle = 0$ за время τ^* .

Изучение внутренних движений. Для изучения движения различных участков белковой глобулы применение метода ЯГР естественно ограничено из-за сравнительно небольшого числа мёссбауэровских атомов (^{57}Fe) в белке. Этот недостаток в известной степени компенсируется применением метода ГР-спектроскопии в сочетании с рентгенодинамическим анализом (РДА), основанным на дифракции рентгеновских лучей на различных атомах. По сравнению с характеристическими частотами движения в белке дифракция рентгеновских лучей есть мгновенный процесс ($\tau \sim 10^{-15}$ с), и поэтому метод РДА практически позволяет определять только статистический беспорядок (дефекты решетки, неупорядоченность в кристалле белка). Фактически здесь определяются не частоты движения, а величины $\langle x_{\text{обш}}^2 \rangle$, обусловленные как статистическим беспорядком, так и реальными движениями атомов при переходах между конформационными подсостояниями:

$$\langle x_{\text{обш}}^2 \rangle = \langle x_{\text{конф}}^2 \rangle + \langle x_{\text{кол}}^2 \rangle + \langle x_{\text{стат}}^2 \rangle,$$

где для белка принято $\langle x_{\text{диф}}^2 \rangle = 0$, а $\langle x_{\text{стат}}^2 \rangle$ считается одинаковым для всех атомов.

Величина $\langle x_{\text{стат}}^2 \rangle$ определяется для атома железа ^{57}Fe как разность величины $\langle x_{\text{обш}}^2 \rangle$, полученной методом РДА, и величины $(\langle x_{\text{конф}}^2 \rangle + \langle x_{\text{кол}}^2 \rangle)$, определенной методом ГР-спектроскопии, при $T > T_k$.

С помощью ГР-спектроскопии учет $\langle x_{\text{стат}}^2 \rangle$ позволяет выделить лишь реальные движения в величинах смещений $\langle x_{\text{обш}}^2 \rangle$, полученных методом РДА для всех атомов белка. Таким образом была получена общая картина подвиж-

ности всех 1261 атома в молекуле метмиоглобина (Г. Фрауенфельдер). Оказалось, что 44 аминокислотных остатка, имеющие максимальную амплитуду смещений боковых цепей больше чем 0,04 нм, лежат на поверхности белка. Смещения внутри глобулы меньше ($A < 0,03$ нм). Заряженные и полярные группы обладают большими смещениями по сравнению с неполярными.

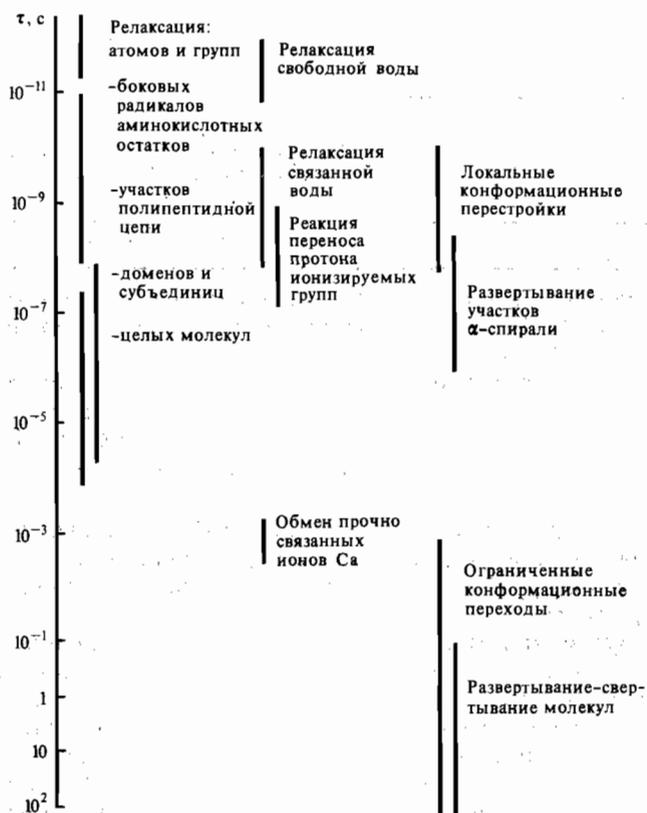


Рис. X.23.

Схема характеристических времен подвижности структуры белков (по А. П. Демченко, 1981)

Интересно отметить, что для остатков, ограничивающих доступ к атому железа, величины A составляют примерно 0,02 нм, что несколько больше, чем для твердого тела. Это меньше амплитуд смещения атомов в проксимальном конце около *гис*-93 и в области *F*-спирали, где происходят динамические изменения (см. рис. X.1 и X.2) с амплитудами $A \sim 0,03 \div 0,04$ нм. Для самого атома Fe характерны спонтанные движения $A \sim 0,03 \div 0,04$ нм в направлении, перпендикулярном плоскости гема, что существенно меньше, чем направленное смещение Fe в плоскость гема ($A \sim 0,05 \div 0,07$ нм) при оксигенации гемоглобина (см. § 1 гл. X).

Общая картина динамической организации белка метмиоглобина на основе метода РДА включает «твердотельное» ядро ($A \leq 0,02$ нм) и «жидкообразную» внешнюю оболочку ($A \geq 0,03 \div 0,04$ нм). Размеры последней при комнатной температуре намного больше, чем размеры «твердотельного» ядра (см. § 2

гл. VII). Величины амплитуд смещений в «жидкообразной» области, превышающие 0,03 нм даже при 80 К, свидетельствуют о том, что эти движения атомов соответствуют переходам между различными конформационными подсостояниями. В «твердотельной» области, где $A \leq 0,02$ нм, конформационные степени свободы практически отсутствуют. Размер «твердотельной» области, как правило, составляет несколько процентов от объема глобулярного белка, причем даже жесткие α -спиральные участки, очевидно, постоянно находятся в движении, испытывая деформационные смещения, колебания, или диффундируют в вязком окружении.

Белок обладает уникальными динамическими свойствами, которые отличают его от твердых и жидких тел, так что термины «твердотельная» и «жидкообразная» носят условный характер. На рис. X.23 приведена классификация подвижности структуры белков по характеристическим временам отдельных видов движения.

Глава XI

Физические модели динамической подвижности белков



По своим динамическим свойствам белок отличается от поведения твердых тел и жидкостей. Это обстоятельство требует создания специальных физических моделей, на основе которых можно было бы установить количественные связи между изменениями макроскопических параметров белка и характеристиками его внутримолекулярной подвижности. Для этого необходимо познакомиться с основными физическими идеями и подходами, лежащими в основе современных представлений о природе, и особенностями динамической подвижности белка.

§ 1. Модель ограниченной диффузии (броуновский осциллятор с сильным затуханием)

Конформационная подвижность белка. Это явление определяется микродвижениями фрагментов белка с амплитудами больше или порядка 0,1 нм, что характеризует переходы между отдельными конформационными подсостояниями. Движение каждого отдельного фрагмента носит ограниченный характер, на который, кроме того, влияет и состояние ближайшего окружения. Так как длина свободного пробега частицы в плотной среде

$$l = \sqrt{mk_B T / \gamma} \ll 0,1 \text{ нм.}$$

(γ — коэффициент трения, m — масса частицы ~ 100 а. е. м.) много меньше амплитуды конформационных движений, то характер движения фрагмента цепи носит диффузионный, или стохастический, характер. Смещение на величины 0,1 нм в конденсированной среде белковой макромолекулы заведомо сопровождается сдвигом отдельных молекулярных групп, окружающих фрагмент. Это требует преодоления потенциальных барьеров, что и соответствует переходам между отдельными конформационными подсостояниями. Вместе с тем физический механизм такого движения, согласно кинетической теории жидкостей Френкеля, эквивалентен движению в вязкой среде или в случае спонтанных движений — диффузии.

Движение фрагмента белка описывается двумя параметрами: конформационным потенциалом $U(x)$ и коэффициентом конформационной диффузии $D(x)$, — зависящими от конформационной координаты x . Зависимость коэффициента диффузии $D(x)$ от конформационной координаты x отражает микрогетерогенный характер белковой среды, что непосредственно связано с неоднородностью потенциальных барьеров. Таким образом, конформационное движение характеризуется двумя пространственными масштабами. С одной стороны, имеется «частокол» из потенциальных барьеров вследствие взаимодействия фрагмента цепи с плотной окружающей средой, препятствующий свободным колебаниям фрагмента. С другой стороны, огибающая минимумов потенциаль-

ной «гребенки» представляет собой профиль значительно более плавно изменяющегося конформационного потенциала $U(x)$, движение вдоль которого связано с деформацией и изменением потенциальной энергии системы (рис. XI.1). Выход за пределы конформационной энергетической ямы, естественно, запрещен вследствие ограниченного характера диффузии фрагмента как составного элемента белковой структуры.

Релаксация фрагмента внутри профиля потенциала $U(x)$ напоминает аperiодическое движение маятника в очень вязкой среде. Примером может служить также распрямление сжатой пружины, погруженной в очень вязкую жидкость или смолу. Что касается конкретного вида кривой $U(x)$, то в гармоническом приближении он, как известно, задается квадратичной зависимостью энергии осциллятора от амплитуды колебаний

$$U = m\omega_0^2 x^2 / 2, \quad (\text{XI.1.1})$$

где ω_0 — частота колебаний. Как было показано (см. § 2 гл. IX), конформационные движения белковых цепей при $T = 200$ К обладают относительно низкими средними частотами $\omega \ll k_B T / \hbar \sim 3 \cdot 10^{13} \text{ с}^{-1}$. В более общем виде зависимость $U(x)$ можно представить как

$$U(x) \sim \alpha |x|^{1/\beta}, \quad (\text{XI.1.2})$$

где $\beta = 1/2$ для гармонического осциллятора.

На рис. XI.2 приведены различные кривые конформационного потенциала в зависимости от изменения параметра β , определяющего в данном случае крутизну и размеры потенциальной ямы, в пределах которой происходит диффузионный переход между отдельными конформационными подсостояниями. Мы ограничимся случаем гармонического потенциала, рассматривая, каким образом величина среднеквадратичного смещения (см. § 1 гл. VII) фрагмента белка изменяется со временем в зависимости от температуры и характера микроокружения.

Формулировка модели. Рассмотрим модель (К. В. Шайтан, А. Б. Рубин, 1981), где анализируется поведение фрагмента белка в сильно структурированной среде, и сравним полученные теоретические выводы с экспериментальными данными.

Основная особенность проблемы состоит в том, что при тепловом равновесии со средой каждый фрагмент испытывает на себе случайные тепловые воздействия окружающей среды, т. е. ведет себя, с этой точки зрения, как броуновская частица. Согласно теореме о равномерном распределении энергии по степеням свободы в состоянии теплового равновесия, средняя поступательная энергия одномерного движения свободной частицы вдоль координаты x равна

$$\langle mv^2/2 \rangle = k_B T / 2, \quad (\text{XI.1.3})$$

где знак $\langle \dots \rangle$ означает усреднение по всем значениям v^2 ($v = dx/dt$ — скорость частицы вдоль x). Однако обсуждаемый фрагмент, находящийся в плотной среде, не является свободным: на него действуют силы, которые условно можно разделить на три типа.

1. Сила упругости участка цепи, обусловленная прочными связями фрагмента с другими молекулярными группами и являющаяся причиной существования конформационного потенциала $U(x)$,

$$F_{\text{упр}} = -dU(x)/dx.$$

Наличие определенной упругости позволяет моделировать движение цепи гармоническим осциллятором, для которого $U(x)$ определяется (XI.1.1), и, следовательно,

$$F_{\text{упр}} = -m\omega_0^2 x, \quad (\text{XI.1.4})$$

где m — масса фрагмента (~ 100 а. е. м. $\sim 10^{-22}$ г); ω_0 — частота конформационных колебаний в отсутствие затухания ($\ll 10^{12}$ с $^{-1}$). Отсюда константа упругости $m\omega_0^2 \sim 10^2$ г/с 2 при $\omega_0 \sim 10^{12}$ с $^{-1}$.

2. Сила трения, направленная против скорости $v = dx/dt$ и пропорциональная ей,

$$F_{\text{тр}} = -\gamma(dx/dt), \tag{XI.1.5}$$

где γ — коэффициент трения.

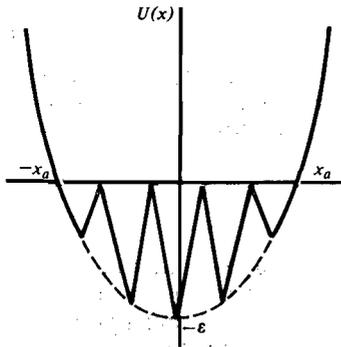


Рис. XI.1. Конформационное движение в вязкой среде (имитация вязкости потенциальной «гребенкой»): x_0 — средняя амплитуда конформационных флуктуаций, $U(x)$ — конформационный потенциал, ϵ — энергия активации конформационных движений

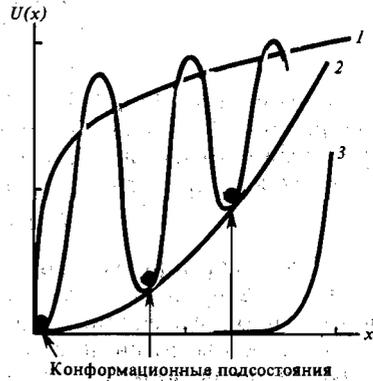


Рис. XI. 2. Прыжковая диффузия по локальным конформационным подстояниям в потенциале $U(x) = \alpha x^{1/\beta}$ при разных β : (по Н. Frauenfelder, G. A. Petsko, D. Gsernoglou, 1979): 1 — $\beta \gg 1$; 2 — $\beta = 1/2$; 3 — $\beta \ll 1$

Описывая сопротивление (трение) среды при движении частицы в терминах микровязкости η , можно оценить коэффициент трения по известной формуле Стокса

$$\gamma = 6\pi b\eta, \tag{XI.1.6}$$

где b ($\sim 0,1 \div 1$ нм) — характерный линейный размер движущегося участка цепи (ср. (VII.1.11)). При $b \sim 0,1$ нм и минимально возможной вязкости $\eta \sim 10^{-3}$ Па·с (равно вязкости воды) коэффициент трения $\gamma \sim 10^{17}$ а. е. м./с.

3. Сила, обусловленная случайными толчками со стороны молекул среды вследствие теплового движения и равная

$$F_{\text{ст}}(t) = \sum_i F_{\text{ст}}(t_i), \tag{XI.1.7}$$

где t_i — случайные моменты времени. Амплитуда силы также случайная величина.

В результате получим уравнение движения фрагмента в плотной среде (уравнение Ланжевена), которое имеет вид

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \gamma \frac{dx}{dt} + \frac{\partial U}{\partial x} = F_{\text{ст}}(t). \tag{XI.1.8}$$

Это и есть модель динамики движения участка цепи в плотной среде под действием тепловых толчков микроокружения. Изменение во времени откло-

нения координаты $x(t)$ от среднего значения носит случайный характер и описывается уравнением (XI.1.8). Это уравнение — стохастическое уравнение, поэтому решить его означает найти функции распределения x и \dot{x} по заданным функциям распределения $F_{cr}(t)$. Решение такого рода уравнений проводят методом корреляционных функций.

Функция корреляции. Данная функция $\varphi(\tau)$ для случайных отклонений $x(t)$ получается путем: 1) умножения случайного значения в начальный момент t , т. е. $x(t)$, на величину $x(t+\tau)$, которую принимает переменная x через дополнительный промежуток времени τ ; 2) последующего вычисления таких произведений для набора начальных значений t и 3) их усреднения по всем t :

$$\varphi(\tau) = \langle x(t)x(t+\tau) \rangle. \quad (\text{XI.1.9})$$

Для стационарного случайного процесса функция корреляции $\varphi(\tau)$ не зависит от начального момента t . Очевидно, чем больше промежуток времени τ , тем с большим основанием можно считать, что $x(t)$ и $x(t+\tau)$ — статистически независимые случайные величины. В этом случае при $\tau \rightarrow \infty$

$$\varphi(\tau) = \langle x(t)x(t+\tau) \rangle = \langle x(t) \rangle \langle x(t+\tau) \rangle = 0, \quad (\text{XI.1.10})$$

где учтено, что среднее значение $\langle x(t) \rangle = 0$.

Таким образом, $\varphi(\tau)$ определяет степень статистической независимости случайных величин $x(t)$ и $x(t+\tau)$. При $\tau = 0$ корреляционная функция равна среднеквадратичному смещению частицы в начальный момент от среднего положения $\langle x(t) \rangle = 0$

$$\varphi(0) = \langle x(t)^2 \rangle, \quad (\text{XI.1.11})$$

которое всегда положительно независимо от знака отклонения. Так как величина $\varphi(\tau)$ не зависит от выбора момента измерения t , а зависит лишь от промежутка времени τ , то, полагая начальный момент времени $t = 0$ и меняя обозначения $\tau = t$, можно записать

$$\langle x^2(t+\tau) \rangle = \langle x^2(t) \rangle \text{ или } \langle x^2(0) \rangle = \langle x^2(t) \rangle.$$

В силу этого

$$\varphi(t) = \langle x(0)x(t) \rangle. \quad (\text{XI.1.12})$$

При больших значениях t справедливо асимптотическое выражение

$$\varphi(t) = \langle x(t)x(0) \rangle \sim \langle x^2(0) \rangle e^{-t/\tau_c}, \quad (\text{XI.1.13})$$

где τ_c — время корреляции стохастического движения, определяющего скорость затухания случайного отклонения x от среднего значения.

Среднеквадратичное смещение. Зависимость от t для броуновского осциллятора среднего квадратичного смещения может быть представлена в виде

$$\langle [x(0) - x(t)]^2 \rangle = \langle [\Delta x(t)]^2 \rangle = 2[\varphi(0) - \varphi(t)]. \quad (\text{XI.1.14})$$

Из (XI.1.14) следует, что если координату измеряли вначале в момент $t = 0$, а затем в момент t_1 , то среднее значение квадрата разности равно удвоенной разности значений корреляционных функций в эти моменты.

Так как $F_{cr}(t)$ — случайная сила, действующая на осциллятор (XI.1.8) со стороны теплового источника (молекулы окружающей среды), то можно показать (К. Хир), что Фурье-образ корреляционной функции (XI.1.13) имеет вид

$$\varphi(\omega) = 2 \int_0^{\infty} \varphi(t) \cos \omega t dt = \frac{2k_B T \gamma}{m^2(\omega_0^2 - \omega^2) + \gamma \omega^2}. \quad (\text{XI.1.15})$$

Обращая Фурье-преобразование (XI.1.15), получим формулы для корреляционной функции $\varphi(t)$ в виде $\varphi(t) = [k_B T / (m \omega_0^2)] e^{-t/\tau_c}$, где $k_B T / (m \omega_0^2) = \langle x^2(0) \rangle$.

1. Для слабозатухающих колебаний в твердом теле при $\omega_0 \gg \gamma / (2m)$

$$\varphi(t) = \frac{k_B T}{m\omega_0^2} e^{-\gamma t/(2m)} \cos \omega_0 t; \quad \tau_c = 2m/\gamma; \quad (\text{XI.1.16})$$

2. Для ограниченной диффузии при $\omega_0 \ll \gamma/(2m)$

$$\varphi(t) = \frac{k_B T}{m\omega_0^2} e^{-\omega_0^2 m t/\gamma}; \quad \tau_c = \gamma/(m\omega_0^2). \quad (\text{XI.1.17})$$

В обоих случаях величина $k_B T/(m\omega_0^2)$ — средний квадрат амплитуды колебательного движения частицы с энергией $k_B T$:

$$\langle x_a^2 \rangle = k_B T/(m\omega_0^2), \quad (\text{XI.1.18})$$

что легко найти из (XI.1.1), используя теорему о равномерном распределении энергии по степеням свободы (XI.1.3).

Значение функции корреляции в (XI.1.16) и (XI.1.17) при $t=0$ также равно среднеквадратичному смещению:

$$\varphi(0) = k_B T/(m\omega_0^2). \quad (\text{XI.1.19})$$

Подставляя (XI.1.15), (XI.1.16) и (XI.1.17) в (XI.1.14), найдем, что для ограниченной диффузии

$$\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle = \langle x_a^2 \rangle (1 - e^{-t/\tau_c}); \quad \tau_c = \gamma/(m\omega_0^2), \quad (\text{XI.1.20})$$

а для колебаний в твердом теле

$$\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle = \langle x_a^2 \rangle (1 - e^{-t/\tau_c} \cos \omega_0 t); \quad \tau_c = 2m/\gamma. \quad (\text{XI.1.21})$$

Выражения (XI.1.20) и (XI.1.21) совпадают с приведенными ранее (X.2.32) и (X.2.27). Выражения (XI.1.16) и (XI.1.17) описывают разные типы движения. В (XI.1.16) среднее время корреляции $\tau_c = 2m/\gamma$ соответствует времени τ_c затухания амплитуды колебательного движения, происходящего с частотой ω_0 . При росте γ время τ_c уменьшается, что равносильно уменьшению времени, за которое успевает произойти заметное изменение амплитуды колебаний вследствие диссипации энергии.

При малых τ_c корреляция между отдельными значениями $x(t)$ и $x(t+\tau)$ быстро теряется. Последовательные значения $x(t)$ и $x(t+\tau)$ будут уже в этом случае независимыми, а значит, функция корреляции обращается в нуль, что следует из (XI.1.16) при $\tau_c \rightarrow 0$.

Выражение (XI.1.17) описывает другой тип движения, а именно ограниченную диффузию в гармоническом потенциале. Оно справедливо при очень больших коэффициентах трения. Время корреляции здесь пропорционально коэффициенту трения $\tau_c = \gamma/(m\omega_0^2)$. Это обусловлено уменьшением скорости диффузии, вызываемой увеличением сил сопротивления или вязкости среды; при этом делокализация частиц в процессе диффузии замедляется.

Изменение спектра γ -квантов. Движение фрагментов, определяемое формулами (XI.1.16) и (XI.1.17), вызывает изменение спектров γ -квантов, излучаемых или поглощаемых ядром в экспериментах по эффекту Мёссбауэра. Известно, что распространение плоской волны (γ -излучения) с затуханием описывается уравнением, в котором амплитуда колебания $A(t)$ пропорциональна:

$$A(t) \sim e^{i\omega_e t - ikx(t) - \frac{1}{2}\Gamma t}, \quad (\text{XI.1.22})$$

где ω_e — резонансная частота колебания; k — волновой вектор; Γ — ширина линии спектра излучения, связанная с естественным временем жизни τ^* возбужденного состояния центров излучения уравнением $\Gamma\tau^* = \hbar$ (X.2.20); $x(t)$ — координата, определяемая положением излучающего (поглощающего) центра. Так как координаты ядер меняются самопроизвольно вследствие тепловых

флуктуаций, то это вызывает «сбой» фазы волны γ -излучения. В результате спектр γ -квантов становится зависимым от динамики ядра, характеризуемой среднеквадратичным смещением ядер за время t :

$$g(\omega) = \frac{\text{Re}}{\pi} \int_0^{\infty} \exp \left\{ -\frac{\Gamma}{2} t - i(\omega - \omega_e) t - \frac{1}{2\lambda^2} \langle [\Delta x(t)]^2 \rangle \right\} dt, \quad (\text{XI.1.23})$$

где $\Gamma \simeq 0,7 \cdot 10^7 \text{ с}^{-1}$ для ^{57}Fe ; ω_e — резонансная частота излучения без отдачи; ω — частота наблюдения; $\lambda = \lambda/(2\pi) = 0,013 \text{ нм}$; $\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle$ — среднеквадратичное смещение ядра за время t .

В жидкостях вследствие неограниченной диффузии $\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle \sim 2Dt$ (см. (X.2.32)), а в твердом теле и белке для $\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle$ справедливы выражения соответственно (X.2.28); (XI.1.21) и (X.2.33); (XI.1.20). Спектральная функция (XI.1.23) нормирована на единицу:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} g(\omega) d\omega = 1.$$

Вероятность поглощения или испускания γ -кванта без отдачи f' задается выражением

$$f' = \int g(\omega) d\omega; |\omega - \omega_e| \sim \Gamma. \quad (\text{XI.1.24})$$

Подставляя выражения (XI.1.21) в (XI.1.23), найдем, что f' для твердых тел при естественном условии $\gamma/m \gg \Gamma$, но $\gamma/(2m) \ll \omega_0$ (т. е. малое затухание):

$$f'(T) = e^{-a^2}, \quad (\text{XI.1.25})$$

где $a^2 = \langle x_a^2 \rangle / (2\lambda^2)$. Выражение (XI.1.25) называется фактором Дебая—Валлера (см. (X.2.26)).

Температурная зависимость $f'(T)$. Согласно (XI.1.25), $f'(T)$ определяется зависимостью $\langle x_a^2 \rangle$ от T и, как следует из соотношения (XI.1.18), должна носить плавный характер:

$$f'(T) = e^{-k_B T / (m\omega_0^2 \tau^*)}. \quad (\text{XI.1.26})$$

где f' медленно уменьшается с увеличением температуры. Однако это не соответствует экспериментальным данным по зависимости $f'(T)$ для белков (см. рис. X.21).

Рассмотрим, чем определяется зависимость $f'(T)$ в случае ограниченной диффузии при сильном затухании $\gamma/(2m) \gg \omega_0$.

Подставляя (XI.1.20) в (XI.1.23), найдем, что

$$f'(T) = 1 - a^2 e^{-a^2} \int_0^1 y^{n(T)} e^{a^2 y} dy, \quad (\text{XI.1.27})$$

где $y = e^{-t/\tau_c} = e^{-m\omega_0^2 t/\gamma}$

$$n(T) = \gamma(T)\Gamma / (2m\omega_0^2) = \tau_c / (2\tau^*).$$

Таким образом, видно, что температурная зависимость фактора $f'(T)$ тесно связана с величиной среднеквадратичного смещения ядра за время жизни $\tau^* \approx 10^{-7} \text{ с}$. Изменение f' от температуры в этом случае определяется не плавной зависимостью (XI.1.18) $\langle x_a^2 \rangle$ от T , а сильной температурной зависимостью времени корреляции $\tau_c = \gamma/(m\omega_0^2)$ вследствие изменения γ с температурой. При этом изменяется отношение τ_c к времени жизни ядра τ^* , а от этого как раз зависит величина его смещения (относительно λ), регистрируемого за время жизни τ^* . В самом деле, при росте температуры основную роль играет не мед-

ленное увеличение параметра $a^2(T)$, а экспоненциальное уменьшение $\gamma(T)$, зависящее от микровязкости η :

$$\tau_c = \gamma / (m\omega_0^2) = 6\pi b\eta / (m\omega_0^2).$$

В случае $\tau_c \gg \tau^*$ вязкость среды столь велика, что ядро не успевает заметно сместиться и достичь границ ямы за время $t = \tau^*$: $\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle \sim t/\tau_c \ll \lambda^2$ и фактор $f' \simeq 1$.

Повышение температуры уменьшает микровязкость

$$\eta(T) \sim e^{\epsilon/(k_B T)}, \quad (XI.1.28)$$

где ϵ — энергия активации микровязкости течения, а значит, с ростом температуры экспоненциально уменьшается время корреляции:

$$\tau_c \sim \eta \sim e^{\epsilon/(k_B T)}. \quad (XI.1.29)$$

Переходя к высоким температурам, где $\tau_c \ll \tau^*$, наблюдается обычная зависимость Дебая—Валлера (XI.1.26), когда за время τ^* величина $\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle$ достигает предельного значения $\lambda^2 a^2$. В промежуточном случае $\tau_c \sim \tau^*$ происходит резкий переход от значений $f' \sim 1$ до $f' \sim e^{-a^2}$. При $\tau_c \gg \tau^*$ спектр $g(\omega)$ состоит из узкой мёссбауэровской линии. С ростом температуры происходит плавное уширение спектра до значений ширины $\sim (\Gamma + a^2/\tau_c)$. Затем, когда при дальнейшем увеличении температуры становится $\tau_c \leq \tau^*$, происходит быстрое уширение «крыльев» спектральной линии с резким уменьшением интенсивности в центральной части спектра и падением значений f' . При $\tau_c \ll \tau^*$ уширенная часть спектра воспринимается как гладкий фон, на котором резко выделяется узкая линия (рис. XI.3).

Таким образом, резкое уменьшение фактора f' в ограниченной области температур без уширения спектральной линии связано не с увеличением полной амплитуды движения x_a , а с уменьшением времени корреляции ниже критического значения $\tau_c \approx 10^{-7}$ с. Полученные формулы применяют при анализе экспериментов по подвижности белков, выполненных методами γ -резонансной спектроскопии. Формула (XI.1.27) для вероятности процессов без отдачи справедлива не только в случае модели броуновского осциллятора. Основными здесь являются вид корреляционной функции (XI.1.20) и пропорциональность $\tau_c \sim e^{\epsilon/(k_B T)}$ (XI.1.29).

В частности, в рамках этой же теории можно рассмотреть и другую модель конформационных движений — движение в «вязком ящике» при наличии выделенного потенциального барьера. В этом случае, как показывают расчеты, величина энергии активации ϵ складывается из высоты барьера и энергии активации микровязкости. Обработка соответствующих экспериментальных данных для миоглобина и хроматофоров показала, что значение микровязкости в окружении мёссбауэровского атома при линейных размерах фрагмента $b \sim 0,5$ нм составляет при 300 К ~ 10 Па·с. Это намного превышает вязкость воды (10^{-3} Па·с), глицерина (~ 1 Па·с) и среднюю вязкость биологической мембраны (0,1—1 Па·с). Энергия активации вязкого течения ϵ , определенная по зависимости $f'(T)$, составляет 21 кДж/моль, амплитуда конформационного движения $x_a = 0,035$ нм (амплитуда валентных колебаний атома Fe намного

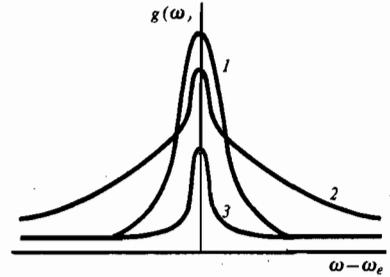


Рис. XI.3. Изменение формы мёссбауэровского спектра $g(\omega)$ при изменении времени релаксации τ , с (увеличение температуры):
1— $\tau \gg 10^{-7}$; 2— $\tau \approx 10^{-7}$; 3— $\tau \ll 10^{-7}$

меньше $x_0 \sim 0,001 \div 0,002$ нм). Все это свидетельствует о жесткой связи атома ^{57}Fe с белком, обладающим плотной структурой. Подвижность атома Fe определяется целиком движением соответствующего фрагмента молекулы белка. Дегидратация белка и увеличение вследствие этого вязкости белка с падением содержания воды должно также приводить к росту фактора f' , что и наблюдается на опыте.

Для степеней свободы, где амплитуда движений не превышает 0,1 нм, существование выделенного барьера для конформационных флуктуаций наряду с потенциальной «гребенкой» маловероятно. Однако возможно наличие таких конформационных потенциалов в более сложных системах с выделенными локальными положениями равновесия.

В настоящее время существует ряд других формулировок модели, основанной на представлениях о движении фрагментов белка по типу броуновского осциллятора с сильным затуханием.

§ 2. Модель дискретных состояний и фазовых переходов

Рассмотрим другую модель подвижности белка, которая включает два выделенных конформационных состояния с узкими потенциальными «ямами», разделенными относительно широким ($\sim 0,05$ нм) барьером (Г. Фрауенфельдер). При низких температурах частица локализована в одной из «ям» и фактор $f' \simeq 1$. При повышении температуры частица за время τ^* успевает совершить перескоки между «ямами», что приводит к уменьшению вероятности f' и деформации спектра.

Как показывают расчеты (К. В. Шайтан) при условии, что длина прыжка $l \geq \lambda$, фактор f' должен составлять в среднем величину

$$\langle f' \rangle_{l \geq \lambda} = \left[\frac{1}{2} + \frac{\Gamma/2}{\Gamma + 4\nu} \right] (\nu \gg \Gamma)^{1/2}, \quad (\text{XI.2.1})$$

где $\nu = (k_B T / h) e^{-E/(k_B T)}$ — средняя частота перескока через барьер высотой E между «ямами». Однако реально фактор f' уменьшается примерно в 20 раз в узком температурном интервале. Расчеты показывают, что в рамках «прыжковой» модели в этом случае необходимо иметь не два, а около 20 конформационных подсостояний, между которыми и должны происходить перескоки. Так как полная амплитуда конформационных изменений за время τ^* не превышает $l < 0,1$ нм, то длина одного прыжка $l \approx 0,005$ нм, т. е. $l < \lambda$, и условие $l \geq \lambda$ не выполняется. Иными словами, модель двух дискретных подсостояний должна быть заменена континуальной моделью, где частая потенциальная «гребенка» соответствует наличию сил трения или эффективной микровязкости белкового окружения.

Для согласования с экспериментальными данными такая модель должна содержать две выделенные квазиравновесные конформации, каждая из которых содержит много микросостояний или конформационных подсостояний (см. § 8 гл. XIII).

Резкий характер температурного перехода $f'(T)$ позволяет также считать, что в этих условиях в белке происходит фазовый переход между подвижной и малоподвижной конформацией, сопровождающийся разрывом слабых связей (Д. С. Чернавский). Конформационный переход из закрытого в открытое состояние заключается в разрыве насыщенных слабых связей и освобождении выделенной степени свободы, после чего система приобретает подвижность и становится молекулярной «машиной» (см. § 1 гл. X). Считая, что размеры подвижных сегментов макромолекулы порядка $R \sim 2$ нм, энергии связей $E \sim$

$\sim 0,2 \div 0,5$ эВ, частоты колебаний в открытом состоянии $\omega_0 \sim 10^{12} \text{ с}^{-1}$, можно найти, что амплитуда колебаний подвижных сегментов, где локализован атом Fe, равна $\langle A \rangle \sim 0,05$ нм. Это намного больше длины волны резонансного γ -кванта (0,013 нм) и, следовательно, в открытом состоянии эффект Мёссбауэра отсутствует: $f' = 0$. В закрытом состоянии амплитуда колебаний сегмента существенно меньше и эффект Мёссбауэра уже определяется жесткостью связей атома Fe с непосредственным локальным окружением. Поэтому изменение фактора f' и подвижности с температурой можно интерпретировать как изменение доли макромолекул, находящихся в закрытом состоянии.

Вероятность застать молекулу в закрытом состоянии при температуре T равна

$$W_{\text{закр}} = (1 + e^{\Delta F/(k_B T)})^{-1}. \quad (\text{XI.2.2})$$

Здесь ΔF — разность свободных энергий двух состояний:

$$\Delta F = F_{\text{закр}} - F_{\text{откр}} = E_{\text{упр}} - n\bar{\epsilon} + nT(\bar{S}_{\text{закр}} - \bar{S}_{\text{откр}}), \quad (\text{XI.2.3})$$

где n — число связей; $\bar{\epsilon}$ и \bar{S} — средние значения энергии связи и энтропии в закрытом и открытом состоянии. В открытом состоянии энергия упругости $E_{\text{упр}}$ отсутствует и связи разорваны, а энтропия каждой группы, участвовавшей в образовании связи, увеличивается. Переход между состояниями происходит при температуре $T_{\text{кр}}$, соответствующей $\Delta F(T_{\text{кр}}) = 0$, которая равна $T_{\text{кр}} = (n\bar{\epsilon} - E_{\text{упр}}) / (n\Delta S)$. В этой модели

$$f' = [1 - e^{\Delta F/(k_B T)}]^{-1}. \quad (\text{XI.2.4})$$

Соответствие формулы (XI.2.4) экспериментальным данным наблюдается при $n\bar{\epsilon} - E_{\text{упр}} = 0,33$ эВ и $n\Delta S = 20$ э. е.

Формула (XI.2.3) совпадает с выражениями, описывающими фазовые переходы первого рода в термодинамически неравновесных системах. Специфика сегментального перехода проявляется в том, что изменение энтропии происходит только в системе слабых связей, а изменение энергии — во всей системе.

Изменение энтропии должно зависеть от влажности, если в подвижном состоянии образуется полость, которая содержит несколько связанных молекул воды. В неподвижном состоянии полость закрывается и молекулы воды вытесняются в окружающее пространство. В модели ограниченной диффузии (см. § 1 гл. XI) под ΔF и ΔS надо понимать свободную энергию и энтропию активации микровязкости. Большое изменение энтропии $\Delta S \approx 20$ э. е. в фазовом переходе указывает на сложный характер молекулярной картины происходящих при этом процессов.

§ 3. Численное моделирование молекулярной динамики белков

Атомы, входящие в состав белковой молекулы, испытывают различные воздействия со стороны микроокружения и принимают участие в разнообразных видах движения. Крайне быстрые тепловые движения тесно связаны с редкими, в том числе функционально важными, перестройками. Внутренние движения глобулярных белков характеризуются изменениями амплитуды от 10^{-3} до 10 нм, энергии — от 0,4 до 420 кДж/моль, времен — от 10^{-15} до 10^3 с. Движение атомов и их групп в белке происходит как бы в клетке из окружающих атомов. На малых временах ($\sim 10^{-13}$ с) такие группы совершают колебательные движения относительно малой амплитуды ($\leq 0,02$ нм). На больших вре-

менах происходят коллективные смещения окружающих атомов, имеющие локальный, либо захватывающий всю молекулу характер.

Нативный белок при комнатной температуре обладает целым набором возможных конформаций. Большинство из них находится вблизи средней конформации, которая может быть получена из рентгеноструктурных данных. Однако в каждый данный момент положение ряда атомов значительно отличается от средних положений. Такие флуктуации относительно усредненной структуры, вызванные тепловыми движениями атомов, играют важную роль в функционировании белка. Возникает вопрос: каков вклад движений отдельных атомов и особенно флуктуаций около их равновесных положений в конформационные переходы в белках?

В гл. VIII, IX было показано, что конформационная энергия белка определяется совокупными атом-атомными взаимодействиями и может быть аппроксимирована потенциальными функциями типа (IX.1.1). Получающиеся в результате учета этих взаимодействий энергетические карты дают усредненные координаты атомов в соответствии с условием минимума общего конформационного потенциала (см. рис. IX.10). Таким путем, однако, невозможно непосредственно проследить за движениями и флуктуациями положения отдельных атомов. Другой подход основан на решении классических уравнений движения для отдельных атомов, в которых движущие силы определены из известных потенциальных функций атом-атомных взаимодействий.

Метод динамического моделирования. С помощью этого метода удается получить подробную информацию о быстрых мелкомасштабных процессах, длящихся в течение всего лишь нескольких пикосекунд ($1 \text{ пс} = 10^{-12} \text{ с}$) и вовлекающих несколько десятков или сотен атомов.

В качестве модели молекулярной системы, содержащей N атомов, берут совокупность N взаимодействующих материальных точек, движение которых описывается классическими уравнениями Ньютона:

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \mathbf{F}_i \quad (i = 1, \dots, N). \quad (\text{XI.3.1})$$

Материальные точки «моделируют» атомы, m_i — их массы, \mathbf{F}_i — действующие на них силы. Координаты и скорости всех частиц в исходный момент времени определяют ее поведение в последующие моменты времени. Современные ЭВМ позволяют проводить численное интегрирование таких уравнений для нескольких сотен или тысяч атомов на временах 10^{-11} — 10^{-10} с. Получающиеся траектории движения всех атомов дают совокупную картину развития структурных флуктуаций во времени. В рассматриваемой механической системе в процессе ее движения сохраняется полная энергия. Температура определяется по теореме о равном распределении кинетической энергии по степеням свободы:

$$\frac{3}{2} k_B T = \left\langle \frac{m_i v_i^2}{2} \right\rangle, \quad (\text{XI.3.2})$$

где среднее берется как по всем частицам, так и по времени.

Как было показано (см. гл. VIII и IX), конформационная энергия белковой молекулы определяется совокупными атом-атомными взаимодействиями и может быть аппроксимирована потенциальной функцией:

$$U(r_1, \dots, r_N) = \frac{1}{2} \sum k_b (b - b_0)^2 + \frac{1}{2} \sum k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \frac{1}{2} \sum k_\phi [1 + \cos(n\phi - \delta)] + \\ + \sum \left(\frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} + \frac{q_1 q_2}{Dr} \right) + \sum \left(\frac{A'}{r^{12}} - \frac{C'}{r^{10}} \right). \quad (\text{XI.3.3})$$

В приведенном выражении для потенциальной энергии суммирование проводится по всем валентным связям, валентным углам, двугранным (торсионным) углам, валентно не связанным парам частиц и парам частиц, образующим водородную связь, соответственно. Константы в формулах зависят от типа связи и сортов частиц; b — длина валентной связи; Θ — величина валентного угла; φ — двугранный угол; r — расстояние между частицами. Сила, действующая на i -ю частицу, легко вычисляется из выражения для потенциальной энергии:

$$F_i = - \frac{dU(r_1, \dots, r_N)}{dr_i} \quad (\text{XI.3.4})$$

Первые вычислительные эксперименты для белковой молекулы — ингибитора трипсина (ИТ) панкреатической железы — были проведены по описанной выше процедуре в 1977 г. Дж. А. Мак-Кэмоном с сотрудниками. Эта молекула состояла из 58 аминокислотных остатков и содержала 454 тяжелых атома. Помимо них при динамическом моделировании в структуру включились еще четыре внутренние молекулы воды, локализованные согласно кристаллографическим данным. Интегрирование уравнений движения проводили с шагом по времени около 10^{-15} с. Основной элемент вторичной структуры этого белка — антипараллельная скрученная β -структура, существует также короткий α -спиральный сегмент.

Молекулярная динамика ИТ. Более полные результаты моделирования внутренней динамики ИТ приведены в работах М. Карплюса и Дж. А. Мак-Кэмона (1981). Исходные координаты всех тяжелых атомов получались из рентгеноструктурных данных путем минимизации потенциальной энергии конформационных взаимодействий. Скорости задавали равными по значениям, но случайными по направлениям. Кинетическая энергия соответствовала исходной температуре 300 К. Через несколько пикосекунд интегрирования уравнений движения проводили искусственную коррекцию скоростей, поскольку наблюдалось некоторое увеличение средней кинетической энергии (температуры) молекулы. Такую процедуру повторяли несколько раз. В результате через 35 пс система достаточно хорошо приближается к своему равновесному поведению. В конце подготовительного периода средняя кинетическая энергия отвечала температуре 306 К. Эта температура сохраняется в основной период моделирования, когда непосредственно вычисляются траектории движения атомов.

В настоящее время основные результаты получены для периода ~ 100 пс. Оказалось, что усредненная во времени структура несколько отличается от рентгеноструктурных данных: 0,21 нм для атомов α -углерода и 0,29 нм для всех остальных атомов. Наибольшие отклонения в положении основной цепи наблюдаются на обоих концах молекулы, а отклонения в положениях боковых цепей происходят в основном в случае заряженных групп, доступных действию растворителя. Это, видимо, связано с достаточно тонкими деталями описания взаимодействия внутрибелковых групп. Погруженное в центре молекулы белка ядро обладает плотностью ($63 \text{ атомов} \times \text{нм}^{-3}$), близкой к таковой по рентгеноструктурным данным ($60 \text{ атомов} \times \text{нм}^{-3}$). Флуктуации положений атомов в белке по отношению к усредненной во времени структуре составляют для α -углеродных 0,06 нм и для всех остальных атомов 0,075 нм. Флуктуации на концах цепи существенно выше (до 0,12 нм). Флуктуации в значениях двугранных углов (см. § 3 гл. VIII) лежат в пределах 10 — 20° для углов φ и ψ и 7 — 9° для угла ω , причем в области β -структуры они больше, чем в α -спирали.

Временной характер затухания корреляций координат и скоростей атомов. Его можно также исследовать методом динамического моделирования, по-

скольку в нем используются корреляционные функции (см. (XI.1.9)). Фурье-преобразование (см. (XI.1.15)) корреляционных функций дает частотный спектр флуктуаций, что позволяет выделить частоты, дающие основной вклад во временной характер затухания флуктуаций. Обычно корреляционные функции смещения атомов в молекуле ИТ характеризуются монотонным затуханием с временем затухания 1—2 пс. Быстрое затухание корреляционной функции ясно указывает на случайный диффузионный (броуновский) характер смещений атомов в пикосекундном временном интервале. Основной вклад дают вращения атомных групп вокруг единичных связей (см. § 3 гл. VIII), поскольку колебания вдоль локальных валентных связей не влияют эффективно на величину общего смещения атомов, хотя могут накладываться на затухания корреляционной функции в виде высокочастотных компонентов.

Большой интерес представляют также обнаруженные флуктуации в значениях отдельных составляющих (см. (XI.1.1)) потенциальной энергии относительно величин, усредненных по 96 пс интервалу. Эти флуктуации составляющих общей энергии варьировали от 20 до 60 кДж/моль и сохранялись достаточно долго (2—15 пс). Однако значения общей потенциальной энергии давали меньшие флуктуации (4—16 кДж/моль в течение 2—5 пс) за счет взаимной компенсации одновременно возникающих отклонений в энергиях ван-дер-ваальсовых взаимодействий и внутреннего вращения вокруг единичных связей. Наряду с долгоживущими энергетическими флуктуациями в системе происходит также долгоживущие (до 20 пс) флуктуации в положениях α -углеродных атомов. Последние скорее всего связаны с переходами макромолекулы белка из одного конформационного подсостояния в другое на поверхности общей потенциальной энергии. В пользу этого свидетельствует корреляция между временами затухания таких энергетических флуктуаций и временами структурных переходов в белке между отдельными ротамерами в боковых цепях.

Детальное исследование динамики ароматических белковых цепей в молекуле ИТ показало решающую роль микроокружения в процессах релаксации возникающих флуктуационных изменений. Ароматическое кольцо *тир-21* в белке ИТ находится в окружении других аминокислотных остатков, так что положение минимума потенциальной энергии на энергетической карте для него жестко определено по сравнению со свободным дипептидом, в котором ароматическое кольцо испытывает влияние только со стороны основной цепи (см. § 1, 2 гл. IX). На рис. XI.4 показаны флуктуации угла (Φ) вращения ($\Delta\Phi$) *тир-21*, выраженные как отклонения от среднего значения $\langle\Phi\rangle$.

Из рисунка видно, что вращательное движение кольца *тир-21* в белке носит менее регулярный характер по сравнению со свободным фрагментом вследствие столкновений с атомами микроокружения. Зависимость от времени нормированной корреляционной функции

$$\varphi(t) = \langle \Delta\Phi(t)\Delta\Phi(0) \rangle / [\langle \Delta\Phi(0)^2 \rangle]$$

приведена на рис. XI.5. Как видно, она быстро затухает в белке по сравнению с изолированным *тир-21*. Уравнение движения кольца *тир-21* является уравнением Ланжевена (XI.1.8) и имеет в данном случае вид

$$I \frac{d^2\Phi}{dt^2} + \gamma \frac{d\Phi}{dt} + \alpha\Phi = F_{ct}(t), \quad (XI.3.5)$$

где $\Phi(t)$ описывает флуктуации угла вращения; $I = 7,5 \cdot 10^{15}$ г·см/моль — момент инерции ароматического кольца относительно оси вращения; γ — коэффициент трения; α — константа жесткости; $F_{ct}(t)$ отражает случайные толчки, испытываемые кольцом во время флуктуаций микроокружения. Среднее время между заметными изменениями $F_{ct}(t)$ составляет $\sim 0,07$ пс. Как видно из

рис. XI.5, за этот короткий промежуток Φ не успевают заметно измениться. $F_{ст}(t)$ — случайная величина с гауссовым распределением, и описываемые ею отдельные толчки влияют на движение кольца. Значения коэффициентов в (XI.3.5) составляют, как показывает обработка экспериментальных данных, величины $\alpha = 5,5 \cdot 10^4$ Дж/(рад²·моль); $\gamma = 0,11$ г·см/(с·моль), а время затухания $\tau = \gamma/\alpha = 0,2$ пс.

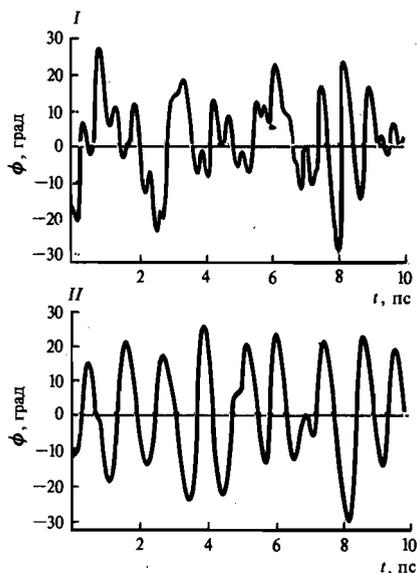


Рис. XI. 4.

Изменение угла вращения кольца *тир*-21 (I) и изолированных тирозиновых фрагментов (II) при динамическом моделировании в белке за время 9,8 пс (по М. Karplus, В. R. Celin, J. A. McCamton, 1979)

$\Delta\Phi = \Phi - \langle \Phi \rangle$. Вращательное движение кольца *тир*-21 в белке носит менее регулярный характер по сравнению со свободными фрагментами вследствие столкновений с атомами микроокружения.

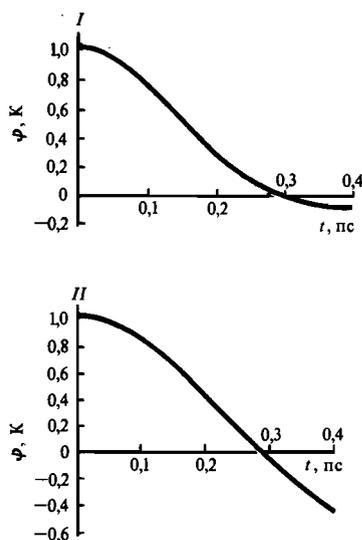


Рис. XI.5.

Нормированная временная корреляционная функция отклонений тирозинового кольца в белке (I) и в изолированном тирозиновом фрагменте (II) (по М. Karplus, В. R. Celin, J. A. McCamton, 1979)

Развитие методов динамического моделирования позволяет исследовать молекулярные перестройки, требующие преодоления активационных энергетических барьеров. Сюда, в частности, относятся и исследованные в работах М. Карплуса и Дж. А. Мак-Кэмона вращения ароматического кольца *тир*-35, глубоко «погруженного» в молекулу белка. Так как константы активационных процессов в белках, как правило, не превышают 10^9 с⁻¹, то необходимо было модифицировать обычные методы моделирования с периодами интегрирования уравнений не больше 10^{-10} — 10^{-11} с.

На первом этапе моделирования конфигурации атомов в различных переходных состояниях, которые занимают места вблизи энергетического барьера, разделяющего на энергетических картах энергетические «овраги» начального и конечного состояний. Моделирование непосредственно процесса перехода осуществляли путем вычисления траекторий движения атомов через эти переходные состояния при заданных начальных скоростях их движения.

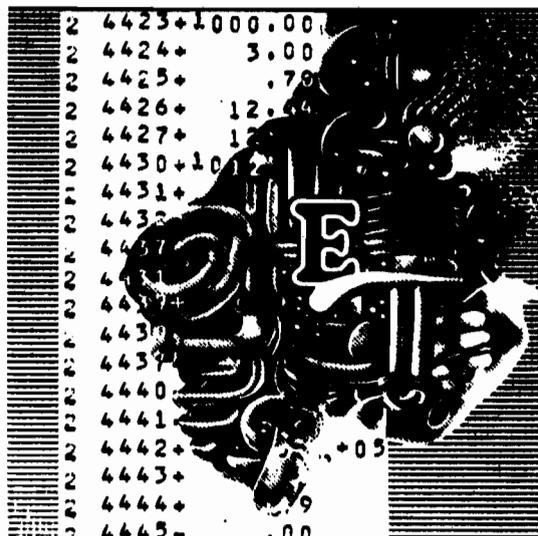
Оказалось, что кольцо *тир*-35 пересекает потенциальный барьер вращения

за 0,5—1,0 пс. Эффекты трения замедляют переход, но не могут повернуть его в обратном направлении.

Таким образом, рассмотренные данные ясно показывают, что в пикосекундном временном интервале происходят локальные движения атомов на всех уровнях организации молекулы белка. В целом флуктуации положений атомов в молекуле белка являются неотъемлемой частью молекулярной динамики. Они характеризуются относительно большими временами ($\sim 10^{-11}$ с) и длятся достаточно долго, что несомненно имеет функциональное значение. Так, удалось показать, что в молекуле белка за счет корреляции флуктуаций отдельных атомов образуются сообщающиеся с внешней средой полости размером до $\sim 10^{-1}$ нм³ и с временем существования $\sim 10^{-7}$ с. Это создает условия для проникновения внутрь белковой глобулы отдельных молекул воды. Следовательно, в белке как конденсированной системе, не обладающей, однако, жесткостью и упругостью твердого тела, небольшие спонтанные изменения структуры происходят в результате локальных конформационных флуктуаций уже за несколько пикосекунд. Корреляция этих флуктуаций может привести к большим по масштабу структурным сдвигам и переходам между отдельными конформационными состояниями. Тепловые движения атомов оживляют усредненную рентгеноструктурную картину строения белка и лежат в основе физических причин спонтанных конформационных перестроек. Несомненна роль флуктуаций в электронно-конформационных взаимодействиях, сопровождающих процессы транспорта электронов, миграции и трансформации энергии, ферментативного катализа в биологических структурах.

V

Электронные свойства биополимеров



XII

Электронные переходы в биополимерах

XIII

Механизмы переноса электрона
и миграции энергии в биоструктурах

XIV

Механизмы ферментативного катализа

Глава XII

Электронные переходы в биополимерах



Внутримолекулярная подвижность биополимеров (белков), рассмотренная в предыдущих главах, в обычных условиях носит самопроизвольный характер и обусловлена тепловым движением. Однако изменение электронного состояния белка вызывает определенные конформационные переходы. Они происходят в направлении достижения нового равновесия и минимума энергии, которое соответствует измененному электронному состоянию макромолекул. Ниже будут рассмотрены непосредственно электронные свойства биополимеров, особенно механизмы миграции энергии возбуждения и переноса электрона в связи с функциональной активностью.

Эти процессы сопровождаются электронными переходами, которые требуют для своего описания привлечения аппарата квантовой механики. Этот материал не претендует на полноту изложения основ квантовой механики, но может восполнить пробелы в этой области физики у специалистов, имеющих фундаментальное биологическое образование.

§ 1. Квантово-механические представления об электронном строении молекул

Полную энергию (E) молекулы можно приближенно представить в виде суммы электронной ($E_{эл}$), колебательной ($E_{кол}$) и вращательной ($E_{вр}$) составляющих:

$$E = E_{эл} + E_{кол} + E_{вр}, \quad (\text{XII.1.1})$$

где обычно $E_{эл} \gg E_{кол} \gg E_{вр}$.

Разделение электронной и колебательной энергии является следствием того, что движение электронов и электронные переходы между энергетическими уровнями можно рассматривать в поле неподвижных ядер согласно принципу Франка—Кондона (см. § 2 гл. X). В условиях установившегося термодинамического равновесия вероятность (p) заселенности i -го энергетического уровня определяется распределением Больцмана и для дискретных значений энергии имеет вид

$$p = \frac{1}{Z} g_i e^{-E_i/(k_B T)}, \quad (\text{XII.1.2})$$

где g_i — статистический вес, или кратность вырождения i -го уровня, или число различных состояний молекулы с одинаковой энергией E_i ; $Z = \sum_i g_i e^{-E_i/(k_B T)}$ —

статистическая сумма (см. (VIII.3.8)).

Для колебательных уровней обычно $E_{кол} \geq k_B T$, так что возбужденные колебательные уровни заметно заселяются главным образом при повышенных температурах. Энергия, необходимая для изменения электронного уровня мо-

лекулы, $E_{эл} \gg k_B T$, поэтому при комнатной температуре все молекулы находятся на нижнем уровне электронной энергии. Переходы между энергетическими, в первую очередь электронными, уровнями определяют основные спектральные свойства молекул. Наибольший интерес представляют электронные переходы в белках и нуклеиновых кислотах, которые определяются системой делокализованных π -электронов.

Физические представления о строении электронных оболочек сложных молекул, широко используемые в современной биофизике, основаны на квантово-механической теории. Согласно квантовой механике, положение электрона в пространстве описывается волновой функцией $\Psi(x, y, z)$, зависящей от пространственных координат x, y, z . Квадрат абсолютной величины волновой функции $|\Psi_i(x, y, z)|^2$ для данного состояния i в точке (x, y, z) дает вероятность нахождения электрона в элементе объема $dx dy dz$

$$p_i(x, y, z) = |\Psi(x, y, z)|^2 dx dy dz. \quad (\text{XII.1.3})$$

Состояние электронов в молекулах также описывается волновой функцией, которая и определяет электронную орбиталь. Например, для электрона, находящегося в атоме водорода в $1s$ -состоянии, волновая функция имеет вид

$$\Psi = \Psi(r) = \pi^{-1/2} a_0^{3/2} e^{-r/a_0}, \quad (\text{XII.1.4})$$

где $a_0 = \hbar^2 / (me^2)$ — величина боровского радиуса; r — расстояние от электрона до протона. Отсюда следует, что вероятность нахождения электрона около протона в атоме водорода убывает экспоненциально с расстоянием по всем направлениям

$$p \sim e^{-2r/a_0}, \quad (\text{XII.1.5})$$

что и определяет сферически симметричную картину s -орбитали. Зная волновую функцию, можно найти все основные физические величины и параметры, характеризующие систему.

Уравнение Шредингера. Для определения энергии стационарных состояний системы служит фундаментальное уравнение, которое ввел Э. Шредингер. Оно связывает энергию электронной системы с волновой функцией. В простейшей форме для одного электрона уравнение Шредингера имеет вид

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \left(\frac{\partial^2 \Psi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \Psi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \Psi}{\partial z^2} \right) + U(x, y, z) \Psi = E \Psi, \quad (\text{XII.1.6})$$

где $U(x, y, z)$ — потенциальная энергия электрона; E — полная энергия системы. Как видно, уравнение (XII.1.6) определяет стационарные или не зависящие от времени состояния и значения собственной энергии электронной системы. Оно представляет собой линейное дифференциальное уравнение (Ψ входит в первой степени) в частных производных второго порядка ($\partial^2 / \partial x^2$) относительно неизвестной функции Ψ . В сокращенном виде стационарное уравнение (XII.1.6) может быть записано как

$$\hat{H} \Psi = E \Psi \quad (\text{XII.1.7})$$

где

$$\begin{aligned} \hat{H} &= \frac{\hat{p}^2}{2m} + U(x, y, z) = \frac{\hat{p}_x^2 + \hat{p}_y^2 + \hat{p}_z^2}{2m} + U(x, y, z) = \\ &= -\frac{\hbar^2}{2m} \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) + U(x, y, z) \end{aligned} \quad (\text{XII.1.8})$$

является так называемым оператором Гамильтона, а операторы проекций импульса \hat{p}_x , \hat{p}_y , \hat{p}_z равны соответственно

$$\hat{p}_x = -i\hbar \frac{\partial}{\partial x}, \quad \hat{p}_y = -i\hbar \frac{\partial}{\partial y}; \quad \hat{p}_z = -i\hbar \frac{\partial}{\partial z}. \quad (\text{XII.1.9})$$

Решение уравнения Шредингера позволяет найти электронные волновые функции, или электронные орбитали, и соответствующие значения энергии. Исследование уравнения Шредингера показывает, что для целого ряда модельных систем оно имеет решения лишь в случае определенных дискретных значений энергии E_1, E_2, \dots, E_n . Эти значения энергии называются собственными значениями, а соответствующие им определенные волновые функции — собственными функциями. Очевидно, удовлетворяющие уравнению (XII.1.6) собственные Ψ -функции описывают стационарные состояния, характеризующиеся собственными «квантованными» значениями энергии.

При рассмотрении нестационарных задач зависимость от времени волновой функции

$$\Psi = \Psi(x, y, z, t)$$

определяется временным уравнением Шредингера:

$$i\hbar \frac{\partial \Psi}{\partial t} = \hat{H}\Psi, \quad (\text{XII.1.10})$$

где \hat{H} — оператор Гамильтона (XII.1.8). Если \hat{H} не зависит от времени, то (XII.1.10) имеет решение вида

$$\Psi(x, y, z, t) = \Psi(x, y, z) e^{-\frac{iEt}{\hbar}}. \quad (\text{XII.1.11})$$

Подставляя (XII.1.11) в (XII.1.10), получаем опять дифференциальное уравнение для $\Psi(x, y, z)$, зависящее только от координат, но не от времени:

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \left(\frac{\partial^2 \Psi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \Psi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \Psi}{\partial z^2} \right) + U(x, y, z) \Psi = E\Psi, \quad (\text{XII.1.12})$$

что совпадает со стационарным уравнением Шредингера (XII.1.6). Плотность вероятности $|\Psi(x, y, z, t)|^2$ для решений типа (XII.1.11) не зависит от времени: $|\Psi(x, y, z, t)|^2 = \Psi(x, y, z, t)\Psi^*(x, y, z, t) = |\Psi(x, y, z)|^2$.

Здесь Ψ^* — функция, комплексно сопряженная Ψ . Таким образом, функция (XII.1.11) также описывает стационарное состояние, несмотря на то что в нее входит время t .

Квантовые уровни энергии и квантовые числа. Для атома водорода, где

$$U = -e^2/r, \quad (\text{XII.1.13})$$

решение стационарного уравнения Шредингера дает собственные значения энергии

$$E_n = -\frac{me^4}{2n^2 \hbar^2}, \quad (\text{XII.1.14})$$

где n — целое число (главное квантовое число).

В этом случае волновая функция электрона в атоме водорода оказывается зависящей от трех целых чисел n, l и m (квантовые числа), т. е. имеет общий вид $\Psi_{n,l,m}(x, y, z)$. Квантовые числа содержат соответственно главное $n=1, 2, \dots$; орбитальное l , которое может иметь значения $0, 1, \dots, n-1$; магнитное m , принимающее при заданном l $2l+1$ значения $-l, -l+1, \dots, -1, 0, +1, \dots, l-1, l$. Основное состояние атома водорода с энергией E_1 описывается волновой функцией $\Psi_{1,0,0}(x, y, z)$ с квантовыми числами $n=1, l=0, m=0$.

Следующему энергетическому уровню E_2 ($n=2$) соответствуют уже четыре

собственные функции: $\Psi_{2, 0, 0}$, $\Psi_{2, 1, 1}$, $\Psi_{2, 1, 0}$ и $\Psi_{2, 1, -1}$, т. е. энергетический уровень E_2 атома водорода четырежды вырожден по энергии. Обычно в спектроскопии функцию, соответствующую состоянию с энергией E_1 , обозначают $1s$, а функции, соответствующие состоянию с энергией E_2 , — $2s$, $2p_x$, $2p_y$ и $2p_z$. Вид этих функций, являющихся решением уравнения Шредингера, и задает направление орбиталей $1s$, $2p_x$, $2p_y$ и $2p_z$ атома водорода.

На рис. XII.1 изображены соответствующие поверхности, внутри которых вероятности нахождения электрона равны 0,95. Существует также четвертое квантовое число s , связанное с собственным магнитным моментом или спином электрона. Проекция спина электрона на определенное направление, которое описывается спиновым квантовым числом s , может быть только $+1/2$ и $-1/2$ в единицах \hbar . В основном состоянии атома водорода $n=1$, $l=0$, $m=0$ и, следовательно, момент импульса, обусловленный орбитальным движением, и соответствующий ему магнитный момент будут равны нулю. В этом состоянии общий магнитный момент обусловлен лишь спиновым магнитным моментом.

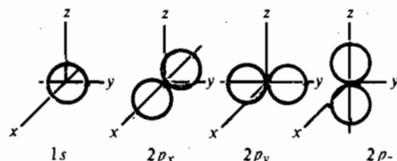


Рис. XII.1.
Форма и направление орбиталей $1s$, $2p_x$, $2p_y$, $2p_z$ атома водорода

Образование молекулярных орбиталей (метод валентных связей).

Образование молекул происходит при взаимодействии атомных орбиталей электронов. При достаточном сближении двух атомов водорода ядро каждого из них начнет притягивать электрон, первоначально связанный только с другим ядром. Тогда волновая функция, описывающая движение и распределение обоих электронов, должна зависеть одновременно от координат обоих электронов. Обычно такую функцию представляют как произведение двух функций, из которых одна зависит от координат только одного, а вторая — от координат другого электрона. Пусть на большом расстоянии электрон 1 локализован на $1s$ -орбитали ядра a , а электрон 2 — на $1s$ -орбитали ядра b . Тогда при сближении ядер полная волновая функция системы должна отражать вероятность независимого нахождения электронов у каждого из ядер:

$$\Psi_1 = \Psi_a(1)\Psi_b(1), \quad (\text{XII.1.15})$$

т. е. распределение вероятностей для системы в целом равно произведению вероятности для ее частей. Здесь $\Psi_a(1)$ и $\Psi_b(2)$ по-прежнему определяются выражением (XII.1.4). Так как электроны неразличимы, то электрон 2 может находиться у ядра a , а электрон 1 — у ядра b . В этом случае волновая функция будет описывать другую, но физически эквивалентную конфигурацию электронов:

$$\Psi_2 = \Psi_a(2)\Psi_b(1), \quad (\text{XII.1.16})$$

где $\Psi_a(2)$ и $\Psi_b(1)$ аналогичны (XII.1.4).

Задача состоит в том, чтобы подобрать удачную пробную волновую функцию для молекулы водорода, учитывающую обе конфигурации, и близкую к волновой функции, которая удовлетворяет уравнению Шредингера для этой системы. Тогда, используя пробную волновую функцию и оператор Гамильтона, можно найти среднее значение энергии E . Затем, варьируя параметры, от которых зависит пробная волновая функция, надо найти минимальное значение энергии и тем самым одновременно уточнить вид пробной функции, «улучшив» ее.

Часто пробная функция для основных состояний молекулы записывается в виде линейной комбинации Ψ_1 и Ψ_2 , в которой учтены две электронные конфигурации:

$$\Psi = C_1\Psi_1 + C_2\Psi_2 = C_1\Psi_a(1)\Psi_b(2) + C_2\Psi_a(2)\Psi_b(1), \quad (\text{XII.1.17})$$

где C_1 и C_2 — константы.

Затем, варьируя значение параметров в (XII.1.17), устанавливают, при каких величинах C_1 и C_2 энергия E становится минимальной.

Расщепление энергетических уровней. В упрощенно описанном методе валентных связей оказываются возможными два случая:

$$\Psi_C = \frac{1}{2(1+S^2)} [\Psi_a(1)\Psi_b(2) + \Psi_a(2)\Psi_b(1)] \quad (\text{XII.1.18})$$

и соответствующая этому случаю энергия

$$E_C = 2E_H + \frac{C+A}{1+S^2}, \quad (\text{XII.1.19})$$

а также

$$\Psi_A = \frac{1}{2(1+S^2)} [\Psi_a(1)\Psi_b(2) - \Psi_a(2)\Psi_b(1)], \quad (\text{XII.1.20})$$

где соответственно $E_A = 2E_H + \frac{C-A}{1+S^2}$. (XII.1.21)

В уравнениях (XII.1.18) — (XII.1.21) C , A и S — постоянные при данном расстоянии между ядрами; E_H — энергия основного состояния свободного атома водорода; C определяет энергию кулоновских взаимодействий в системе ядра — электроны; S — перекрытие атомных волновых функций; A — так называемый обменный интеграл, куда входят произведения $\Psi_1\Psi_2$, что отражает тождественность двух электронов при составлении общих волновых функций в системе.

Как видно, функция Ψ_C в (XII.1.18) симметрична относительно обмена обоих электронов, а вторая функция Ψ_A в (XII.1.20) антисимметрична, так как при обмене электронов изменяет свой знак. Детальные расчеты показывают, что в случае обычных значений для расстояний между ядрами имеют место неравенства

$$C < 0, A < 0; |C| \ll |A|. \quad (\text{XII.1.22})$$

Из (XII.1.22) и из соотношений (XII.1.19) и (XII.1.21) вытекает неравенство

$$E_C < 2E_H < E_A. \quad (\text{XII.1.23})$$

Отсюда следует важный вывод, что взаимодействие между атомами водорода приводит к расщеплению исходного уровня $1s$ свободного атома водорода на два уровня. Один уровень характеризуется собственным значением энергии E_C и собственной волновой функцией Ψ_C . Этот уровень при среднем расстоянии находится ниже, чем уровни обоих свободных атомов водорода. В этом состоянии система из двух атомов водорода образует стабильную молекулу с минимумом при $r = r_e$ (рис. XII.2). Электронная плотность в этом состоянии имеет максимум между ядрами, и, следовательно, это обуславливает стягивание ядер. В то же время второй уровень характеризуется значением энергии E_A , большим чем энергия двух свободных атомов, и здесь не образуется стабильной системы. Таким образом, метод линейных комбинаций атомных орбиталей (ЛКАО), примененный к двум атомным орбиталам ($1s$) водорода, приводит к двум моле-

кулярным орбиталям (МО): Ψ_C и Ψ_A . Этот процесс можно представить энергетической диаграммой (рис. XII.3).

Природа химической связи. Свойства симметрии многоэлектронной волновой функции связаны также и с ориентацией электронных спинов. Согласно принципу Паули, полная волновая функция должна быть антисимметрична относительно перестановки двух электронов. Так как нижнее устойчивое состояние описывается симметричной функцией Ψ_C координат электронов, то для этого состояния спиновая функция должна быть антисимметрична. Иными

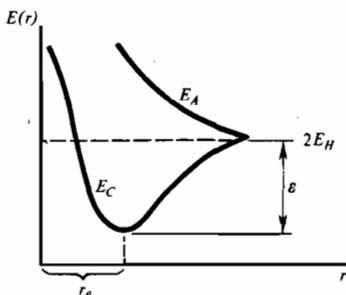


Рис. XII.2.
Зависимость энергии молекулы водорода от расстояния между ядрами:

E_C — кривая, соответствующая притяжению и устойчивой связи;
 E_A — кривая, соответствующая отталкиванию

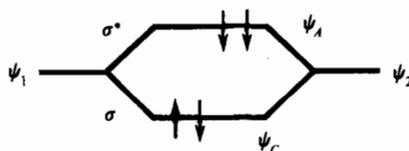


Рис. XII.3.

Энергетическая диаграмма образования молекулярных орбиталей H_2 из атомных орбиталей:

$$\Psi_1 = \Psi_a(1) \Psi_b(2); \quad \Psi_2 = \Psi_a(2) \Psi_b(1);$$

$$\Psi_A = \Psi_1 - \Psi_2; \quad \Psi_C = \Psi_1 + \Psi_2$$

Ψ_C — связывающая орбиталь (σ -орбиталь), Ψ_A — разрыхляющая орбиталь (σ^* -орбиталь)

словами, на симметричной орбитали, согласно принципу Паули, могут разместиться электроны, отличающиеся спиновыми квантовыми числами, т. е. ориентацией спинов. Их суммарный спин равен $+1/2 - 1/2 = 0$.

Антисимметричная по координатам электронов орбиталь Ψ_A , наоборот, будет содержать электроны со сходной ориентацией спинов, и их суммарный спин равен ± 1 . Строение орбитали Ψ_A таково, что электроны с одинаковыми спинами большую часть времени проводят вдали друг от друга, поскольку в состоянии Ψ_A в отличие от Ψ_C минимум электронной плотности находится между ядрами. Вследствие этого ядра отталкиваются друг от друга, что и обуславливает разрыхляющий характер орбитали Ψ_A .

Суммарный спин электронов играет как бы роль указателя, обозначающего характер зависимости энергии молекулы от расстояния между ядрами. Сама химическая связь определяется взаимодействием электрических зарядов, а не взаимодействием спинов. Последнее вызывает корреляцию в движении электронов. В результате в устойчивой молекуле электроны находятся вблизи друг друга между ядрами. При возбуждении светом один из спаренных по спину электронов переходит с орбитали Ψ_C на разрыхляющую орбиталь Ψ_A (рис. XII.4). Характер перекрывания электронных облаков при образовании химической связи может быть различным как по степени перекрывания, так и по направлению (рис. XII.5). Перекрывание σ -орбиталей осуществляется вдоль линии, соединяющей атомы. В результате образуются только молекулярные орбитали с двумя центрами и делокализации σ -электронов не происходит. Как и в молекуле водорода на связывающей орбитали, расположенной между

центрами, здесь находится два электрона с противоположными спинами, а разрыхляющая орбиталь остается незанятой.

Другая ситуация может возникнуть в случае кратных связей при перекрывании p -электронов. Формирование двойной связи с участием четырех валентных электронов приводит к тому, что облака вероятностей образуют две пары перпендикулярно ориентированных p -«гантелей». Одна пара p -электронов

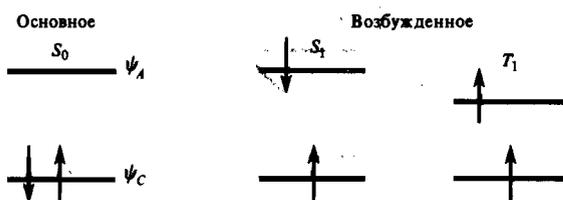


Рис. XII.4. Синглетное (S_1) и триплетное (T_1) состояния.

При возбуждении светом один из спаренных электронов переходит со связывающей орбитали ψ_C на разрыхляющую ψ_A . В этом случае электроны имеют антипараллельные спины и молекула находится в синглетном состоянии. Если реализуется состояние с параллельными спинами, то молекула оказывается в триплетном состоянии. Триплетный уровень по энергии лежит ниже возбужденного синглетного, так как энергия электрон-электронного отталкивания в этом случае меньше.

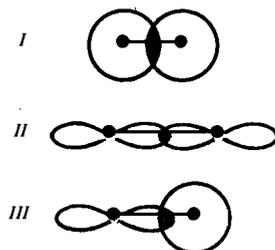


Рис. XII.5. Форма перекрывания электронных облаков: 1— s -состояние, 2— p -состояние, 3— s -и p -состояния.

Единичные связи, образованные при перекрытии двух s -орбиталей, двух p -орбиталей или при перекрывании s -и p -состояний, имеют общую черту, позволяющую объединить их в группу σ -связей, которые характеризуются симметрией электронного облака по отношению к вращению вокруг оси химической связи.

образует обычную σ -связь, другая — максимально перекрывается при условии параллельности гантелеобразных электронных облаков (рис. XII.6). При всяком повороте, выводящем гантели из одной плоскости, перекрывание уменьшается, а энергия системы возрастает. В результате возникают силы, стремящиеся вернуть гантели в параллельное расположение. Параллельная ориентация гантелеобразных облаков p -орбиталей образует π -связь, которая вместе с σ -связью и образует двойную связь. Так же как и σ -связи, в случае π -связи образуются связывающие π - и разрыхляющие π^* -орбитали. Переходы $\pi \rightarrow \pi^*$ требуют поглощения энергии, как правило, меньшей, чем переходы $\sigma \rightarrow \sigma^*$.

Электронные переходы. Вероятность индивидуального электронного перехода между основным и возбужденным состояниями зависит от перекрывания волновых функций основного Ψ_0 и возбужденного состояний Ψ_1 . Сам электронный переход вызывается за счет взаимодействия электрического компонента электромагнитного поля световой волны с электрическим дипольным моментом молекулы. Электрические дипольные переходы между разными состояниями должны сопровождаться движением заряда за счет изменения распределения заряда в этих состояниях. В случае $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходов Ψ_C и Ψ_A в (XII.1.18) и (XII.1.20) обладают разной симметрией распределения электронов. В квантовой механике вероятность перехода из основного в возбужденное состояние (Ψ_1) задается дипольным моментом перехода

$$\mathbf{d}_{01} = \int \Psi_0 \hat{d} \Psi^* dV, \quad (\text{XII.1.24})$$

где dV — элемент объема; $\hat{d} = -er$ — оператор дипольного момента; r — радиус-вектор электрона. Таким образом, с каждым электронным переходом связывается некоторый вектор \mathbf{d}_{01} , имеющий определенное направление, совпадающее с линией, вдоль которой колеблется классический осциллятор. Поэтому

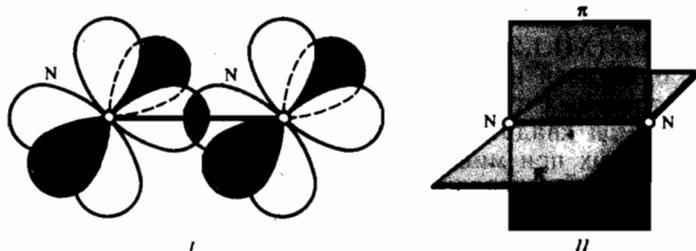


Рис. XII.6.

Химические связи в молекуле азота:

I — расположение электронных облаков, образующих π -связь; II — валентные связи в молекуле азота

электронные переходы и соответствующие полосы поглощения характеризуются поляризацией в зависимости от направления вектора дипольного момента перехода.

Расчеты π -электронной системы. Важнейшей особенностью π -электронов является их делокализация вдоль цепи сопряженных двойных связей. Расчеты π -электронной системы можно проводить с помощью метода, где одноэлектронная молекулярная орбиталь (МО) представляется в виде линейной комбинации атомных орбиталей (ЛКАО) — МО ЛКАО. Для цепочки, состоящей из n атомов, молекулярная орбиталь каждого из π -электронов, представлена как линейная комбинация отдельных волновых функций ψ_i :

$$\Psi = \sum_n C_n \Psi_n, \quad (\text{XII.1.25})$$

где C_n — константы; Ψ_n — водородоподобные волновые функции. С помощью метода МО ЛКАО можно определить в суммарном потенциале атомов цепочки приближенное значение энергии для одного π -электрона, которое будет функцией констант C_n , входящих в (XII.1.25). Для интересных с биологической точки зрения молекул эта задача может быть решена лишь с помощью быстродействующих ЭВМ.

Принцип суперпозиции. Согласно (XII.1.25), система может находиться в нескольких состояниях Ψ_n , обладая в каждом из них определенным значением энергии E_n . Разложение (XII.1.25) соответствует принципу суперпозиции, в котором полная волновая функция системы Ψ может быть представлена в виде линейной комбинации Ψ_n , где C_n — коэффициенты в разложении Ψ по собственным функциям Ψ_n . Квадрат модуля $|C_n|^2$ каждого из коэффициентов разложения в (XII.1.25) определяет вероятность нахождения в состоянии Ψ_n и соответствующего значения энергии E_n системы, описываемой полной волновой функцией Ψ . Сумма вероятностей всех возможных значений E_n должна быть равна единице:

$$\sum_n |C_n|^2 = 1, \quad (\text{XII.1.26})$$

В сущности, этот принцип уже был использован в (XII.1.17). Среднее значение энергии в состоянии Ψ определится как сумма всех собственных значений E_n , умноженных на соответствующие вероятности:

$$E = \sum_n E_n |C_n|^2, \quad (\text{XII.1.27})$$

где $|C_n|^2 = C_n^* C_n$. Можно показать, что справедливо также

$$E = \int \Psi^* \hat{H} \Psi d\tau, \quad (\text{XII.1.28})$$

где \hat{H} — оператор энергии, определяемой из (XII.1.8).

Минимизация средней энергии (XII.1.28) по значениям различных параметров разложения (XII.1.25) позволяет одновременно уточнить вид отдельных молекулярных орбиталей и рассчитать плотность заряда π -электронов, локализованных у отдельных атомов. В свою очередь, плотность заряда на атоме определяется суммой квадратов коэффициентов C_n отдельных молекулярных орбиталей, найденных при минимизации общей энергии системы.

Делокализация π -электронов играет важную стабилизирующую роль за счет взаимодействия π -электронов различных двойных связей. Это легко показать в рамках простейшей схемы Хюккеля. Согласно основной идее метода ЛКАО МО, волновая функция π -электрона может быть представлена в виде (XII.1.25). Коэффициенты C_n и энергии состояний E могут быть найдены из решения системы линейных уравнений:

$$\sum_n C_n (H_{mn} - E S_{mn}) = 0. \quad (\text{XII.1.29})$$

Здесь

$$H_{mn} = \int \Psi_m^* \hat{H} \Psi_n d\tau \quad (\text{XII.1.30})$$

— матричные элементы одноэлектронного гамильтониана (XII.1.8);

$$S_{mn} = \int \Psi_n \Psi_m d\tau \quad (\text{XII.1.31})$$

— интегралы перекрытия атомных орбиталей Ψ_n и Ψ_m .

В приближении Хюккеля пренебрегают перекрытиями Ψ -функций от разных атомов, т. е. принимают, что $S_{mn} = 0$ при $m \neq n$ и $S_{nn} = 1$.

Диагональные матричные элементы $H_{nn} = \alpha$; недиагональные $H_{n, n \pm 1} = \beta$. Остальные $H_{mn} = 0$. Величины α и β называются кулоновским и резонансным интегралом соответственно (ср. (XII.1.19) — (XII.1.21)). Решая систему уравнений (XII.1.29) в приближении Хюккеля, найдем, что в случае этилена связывающая π -орбиталь имеет энергию $E = \alpha + \beta$ ($\beta < 0$), т. е. изолированная π -связь, образованная двумя электронами, характеризуется энергией $2E_1 = 2\alpha + 2\beta$. В молекуле бутадиена содержится 4 π -электрона и соответственно четыре π -орбитали. Энергии двух нижних орбиталей определяются также путем решения системы (XII.1.29): $E_1 = \alpha + 1,62\beta$; $E_2 = \alpha + 0,62\beta$. Следовательно, энергия системы двух сопряженных π -связей есть $2E_1 + 2E_2 = 4\alpha + 4,48\beta$, что на $0,48\beta$ больше энергий двух изолированных π -связей. Выигрыш в энергии $0,48\beta$ обусловлен делокализацией π -электронов.

Согласно расчетам методом МО ЛКАО, энергия стабилизации или энергия резонанса достигает 1 эВ. В § 1 гл. IX было рассмотрено плоскостное строение пептидной группы белков (см. рис. IX.2, IX.4), обусловленное делокализацией p_x -орбиталей атомов N, O, P. Электрон-донорные и электрон-акцепторные свойства биохимических соединений определяются соответственно энергией наивысшей заполненной и наинизшей незаполненной молекулярных орбит. Большинство соединений, играющих ключевую роль в биохимических процессах, включает сопряженные структуры с делокализованными π -электронами. Они, как правило, и определяют важнейшие электронные свойства молекул, проявляющиеся при их превращениях.

§ 2. Электронные спектры биополимеров

Хромофорные группы. Несмотря на большую сложность макромолекул, в них содержатся отдельные составные элементы — хромофоры, обладающие определенными индивидуальными структурными и спектральными характеристиками. Пептидная группа — основной характеристический хромофор полипептидных цепей — дает полосу поглощения при 190 нм, обусловленную $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходами. Другой хромофорной группой является карбонильная группа $>C=O$,

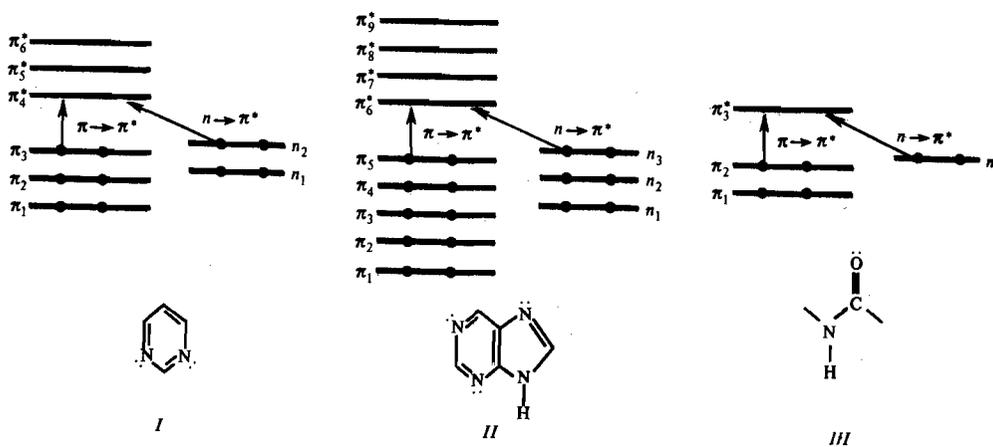


Рис. XII.7.

Электронные уровни и длинноволновые $\pi \rightarrow \pi^* = n \rightarrow \pi^*$ -переходы (показаны стрелками) в пиридиновых (I) и пуриновых (II) основаниях и амидной группе атомов, содержащих пептидную связь (III) (внизу приведены формы соответствующих соединений, неподеленные пары электронов показаны точками)

существующая у всех аминокислот. В поглощение в ультрафиолетовой области спектра вносят свой вклад не только $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходы, но и так называемые $n \rightarrow \pi^*$ -переходы. Они обусловлены тем, что на p -орбитали (n -уровень) кислорода расположена неподеленная пара электронов, не участвующая в образовании связи с углеродом. Поглощение света в области 225 нм вызывает $n \rightarrow \pi^*$ -переходы, в результате которых электрон от неподеленной пары кислорода попадает на разрыхляющую π^* -орбиталь (рис. XII.7). Этот переход является довольно слабым, так как он запрещен в силу перпендикулярного расположения плоскостей π^* -орбитали и p_y -орбитали, занятой n -электронами. Лишь благодаря колебаниям атомов, приводящих к увеличению изгиба молекулы и соответственно увеличению перекрытия, становится возможным $n \rightarrow \pi^*$ -переход. Однако основные хромофоры белка — это остатки ароматических аминокислот: триптофан и в меньшей степени тирозин и фенилаланин. Спектр поглощения триптофана, обусловленный его индольным кольцом с системой сопряженных связей, обладает двумя полосами поглощения с максимумами при 220 и 280 нм. Триптофан обладает ярко выраженной флуоресценцией с максимумом в водном растворе при 330—350 нм, а в белках — около 330—350 нм. Квантовый выход флуоресценции, равный отношению числа высвеченных квантов флуоресценции к числу поглощенных квантов света, составляет в растворе 0,17, а в белках варьирует от 0,02 до 0,4 с длительностью флуоресценции $\tau \sim 2,5 \cdot 10^{-9}$ с. При низких температурах, когда безызлучательная дезактивация триплетного состояния подавлена, триптофан интенсивно фосфоресцирует с $\tau \sim 7$ с, проявляя

три максимума флуоресценции около 410, 440 и 480 нм. Другие ароматические аминокислоты имеют максимумы поглощения при 275 и 222 нм (тирозин) и при 258 нм (фенилаланин). Квантовые выходы их флуоресценции в белках намного ниже.

В нуклеиновых кислотах основными хромофорами являются пуриновые (аденин и гуанин) и пиримидиновые (цитозин и тимин у ДНК, цитозин и урацил у РНК) азотистые основания нуклеотидов. Наряду с $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходами (основ-

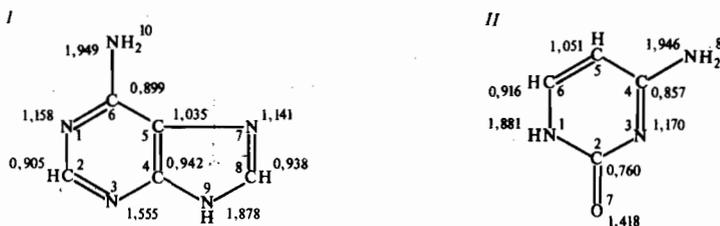


Рис. XII.8.

Значения плотности заряда для нуклеиновых оснований (по Я. Ладику, 1975):

I — аденин, II — цитозин

ная полоса при 260 нм) вклад в общее поглощение дают и $n \rightarrow \pi^*$ -переходы («плечи» в области 280—320 нм) с участием неподеленной пары электронов гетероатомов азота и кислорода. Электронную структуру нуклеотидных оснований исследовали с помощью метода молекулярных орбиталей, в том числе с учётом взаимодействия π -электронов. В результате удалось получить значения плотностей зарядов, локализованных у отдельных атомов. На основании этих данных можно судить о связи реакционной способности с отдельными участками молекулы (А. Пюльман, Б. Пюльман). Так, оказалось, что электрон-акцепторные свойства аденина обусловлены в основном атомом С в положении 6, а электрон-донорные свойства — атомом С в положении 8. Эта закономерность также подтверждается и на примере пиримидиновых оснований, у которых наибольшая π -электронная плотность при атоме С в положении 5 является причиной проявления электрон-донорных свойств (рис. XII.8). При взаимодействии пар оснований друг с другом в молекуле ДНК π -электронные орбитали перекрываются, что вызывает делокализацию π -электронной системы не только у отдельных оснований, но и по всей паре оснований. Система электронных уровней пары оснований обусловлена вкладом каждого из них. Однако расчеты показывают, что вероятность переходов между уровнями, принадлежащими различным основаниям, намного меньше вероятности переходов между уровнями, обусловленными одинаковыми основаниями. Поэтому максимум поглощения гигантской молекулы ДНК совпадает с максимумом, который является усредненным спектром поглощения отдельных оснований. Это справедливо и в случае взаимодействия в динуклеотиде оснований, расположенных одно над другим. Однако, хотя максимум первой полосы поглощения ДНК при 260 нм совпадает с максимумом средней кривой поглощения отдельных оснований, интенсивность поглощения здесь может падать до 10—30%. Это явление называется гипохромизмом длинноволновой полосы. Гипохромизм в области длин волн около 260 нм сопровождается конформационные переходы

неупорядоченная цепь → двойная спираль (рис. XII.9). Объяснение этого явления основано на представлении о резонансном взаимодействии между основаниями нуклеотидов, точнее, о взаимодействии их переходных дипольных моментов при разных ориентациях относительно друг друга.

Согласно законам обычной электростатики, энергия цепочки с параллельными переходными диполями выше, чем их энергия при любой другой ориентации. Это означает, что цепочка с параллельными, но противоположно направленными или коллинеарно (голова к хвосту или голова к голове) расположенными диполями характеризуется более низкой энергией по сравнению с цепочкой параллельных одинаково направленных диполей. Легко видеть, что коллинеарное расположение диполей возможно при ориентации их вдоль цепи, а параллельное — при перпендикулярном расположении относительно цепи молекул. Очевидно, наличие определенной и взаимосогласованной ориентации диполей при условии взаимодействия между всеми хромофорами должно проявляться как сдвиг полосы поглощения регулярной системы диполей в ту или иную сторону спектра по сравнению с изолированными молекулами.

На рис. XII.10 схематично показано, как изменяются уровни энергии возбуждения и интенсивности полос поглощения света в зависимости от взаимной ориентации диполей.

Расщепления полосы поглощения наблюдаются при возбуждении цепочки, состоящей из димеров, в каждом из которых возможны две противоположные ориентации дипольных моментов перехода, включенных в димер (рис. XII.11).

Таким образом, гипохромный эффект в ДНК обусловлен тем, что полоса поглощения при 260 нм вызвана $\pi \rightarrow \pi^*$ -дипольными переходами, векторы которых ориентированы в плоскостях азотистых оснований. Последние в двойной спирали ДНК расположены перпендикулярно оси спирали, т. е. дипольные моменты $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходов параллельны друг другу. Наоборот, «плечо» в спектре поглощения при 282 нм испытывает гиперхромный эффект, так как оно определяется $n \rightarrow \pi^*$ -переходом, поляризованным перпендикулярно плоскости основания. Поэтому в ДНК дипольные моменты $n \rightarrow \pi^*$ -перехода двух тяжелей ориентированы коллинеарно, что и приводит к гиперхромизму. В α -спиральных полипептидах гипохромный эффект наблюдается при 190 нм за счет параллельного расположения дипольных моментов $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходов в α -спиральной конформации. Исчезновение гипохромизма при переходе спираль—клубок может дать количественную меру степени α -спиральности белка.

Энергетическая структура полипептидных цепей. Пептидная группа характеризуется плоскостным расположением своих атомов ($-\text{HN}-\text{CO}-$), при котором достигается наибольшая степень резонансного взаимодействия за счет перекрытия p_α -орбиталей, образующих систему π -связей (см. рис. IX.2). На рис. XII.12 показана схема электронных уровней и указаны орбитали, перекрытие которых обеспечивает стабильные связи в пептидной группе. Возможно слияние орбиталей разных пептидных групп, которые удерживаются водородными связями в периодической структуре белка с образованием единых энерге-

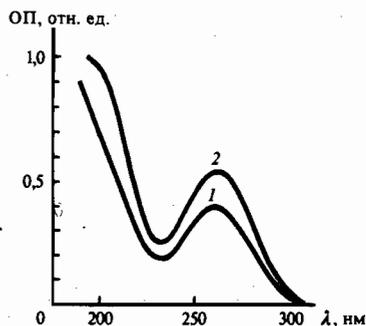


Рис. XII.9. Зависимость оптической плотности (ОП) от длины волны (λ) для спиральной (1) и клубкообразной (2) конформации ДНК тимуса теленка в тяжелой воде (по В. П. Кушнеру, 1977)

тических зон. В такой системе в результате взаимодействия многих пептидных групп каждый молекулярный уровень расщепляется не на два, как в случае двух молекул (см. § 1 гл. XII), а на большое число уровней. С ростом числа групп в цепочке уменьшается разность энергий между расщепленными уровнями. Расстояниями между ними можно пренебречь, а сама область, образующаяся из слияния уровней, носит название энергетической зоны, т. е. каждый

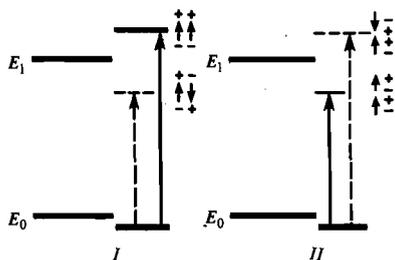
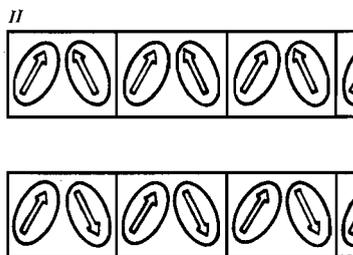
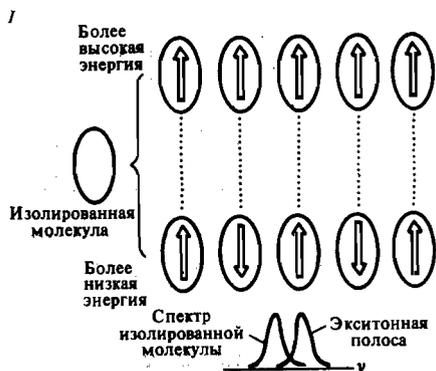


Рис. XII.10.

Уровни энергии (E_0 и E_1) для системы различно ориентированных дипольных моментов перехода (по М. В. Волькенштейну, 1975):

I —параллельное расположение дипольных моментов, II —коллинеарное расположение дипольных моментов

Во всех случаях происходит расщепление уровня энергии изолированной молекулы на два за счет взаимодействия двух соседних диполей. Однако в случае двух параллельных дипольных моментов понижается интенсивность длинноволновой полосы (короткая пунктирная стрелка) и повышается интенсивность коротковолновой (длинная сплошная стрелка). В результате возникает гипохромизм длинноволновой полосы. Напротив, при коллинеарном расположении диполей полоса с большей длиной волны (короткая сплошная стрелка) увеличивает свою интенсивность за счет интенсивности коротковолновой полосы (длинная пунктирная стрелка). Возникает гиперхромизм в длинноволновой полосе



Давыдовское расщепление

Рис. XII.11.

Образование экситонной полосы (I) и давидовское расщепление экситонных полос при наличии двух хромофоров в димере (II) (по П. Эткинсу, 1977)

Величина расщепления между двумя полосами соответствует энергии взаимодействия переходных диполей в ячейке димера. В димере могут присутствовать разные хромофоры с разной ориентацией дипольных моментов перехода. При параллельном расположении диполей это приводит к уменьшению поглощения—гипохромизму в длинноволновой полосе и увеличению поглощения—гиперхромизму в коротковолновой полосе поглощения. При коллинеарном расположении все будет происходить в обратном порядке. В системе взаимодействующих диполей световое возбуждение охватывает сразу большую область, что приводит к образованию коллективных возбужденных состояний. Волна возбуждения, охватывающая одновременно совокупность молекул, называется экситоном (С. Я. Френкель), а расщепление полос поглощения вследствие экситонного взаимодействия—давидовское расщепление (А. С. Давыдов). Перенос энергии возбуждения по экситонному механизму изложен в гл. XIII, § 11.

молекулярный уровень в твердом теле расщепляется в зону. В основе расчета положения уровней в зоне лежит метод кристаллических орбиталей, представляющий собой обобщение простого метода ЛКАО. Волновые функции электронов получают из орбиталей всех атомов твердого тела путем их суммирования с соответствующими коэффициентами. Значения этих коэффициентов, так же как и в методе ЛКАО, должны быть такими, чтобы общая энергия твердого тела

Рис. XII.12.

Переходы в пептидной группе
(в скобках указаны атомы и их орбитали, образующие связи)

Энергетический спектр пептидной группы зависит от взаимного положения связывающих π -, σ - и разрыхляющих π^* -, σ^* -молекулярных орбиталей, а также уровней энергии неподеленной пары электронов n . Энергия электрона на σ -орбиталях ниже таковой на π -орбиталях. В результате сильного перекрытия волновых функций в направлении σ -связи энергия разрыхляющей σ^* -орбитали выше, чем π^* -орбитали

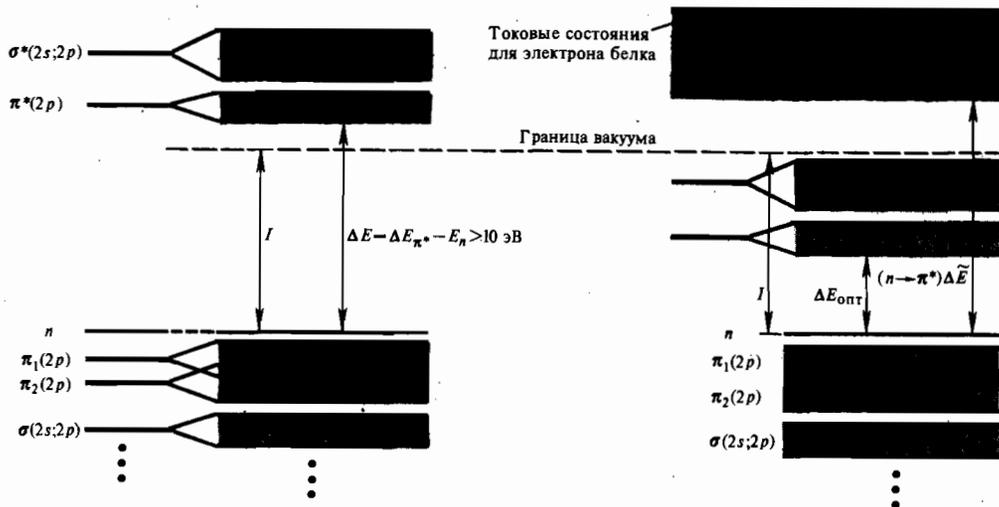
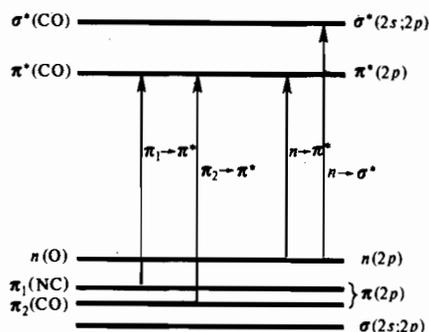


Рис. XII.13

Энергетическая схема одноэлектронных состояний в полипептидной цепи (по Э. П. Петрову, 1984)

Схема рассчитана с учетом волновых функций атомов C, N и O в состояниях 1s, 2s, 2p и состоянии 1s для атома H. Взаимодействие электрона и «дырки» в амидной группе снижает энергию π^* -и σ^* -зон до величины оптического возбуждения ($E_{опт} = 5,7$ эВ). Ширина запрещенной зоны, или энергетическая щель (ΔE) между нижней заполненной и верхней пустой зонами больше 10 эВ. Это превышает величину оптического возбуждения (5,7 эВ) и потенциала ионизации (9,7 эВ). При достаточных энергиях возможен отрыв электрона и его перемещение независимо от «дырки». Однако образованное в результате этого состояние обладает энергией, которая также выше энергии электрона в вакууме

была минимальна. Однако, поскольку в данном случае твердое тело построено из одинаковых повторяющихся единиц, т. е. обладает трансляционной симметрией, между коэффициентами атомных орбиталей получается определенная зависимость. Поэтому можно не решать уравнение с порядком, равным числу атомов в твердом теле, а ограничиться алгебраическими уравнениями степени $2n$ и системой линейных уравнений с $2n$ неизвестными, где n означает число атомов в элементарной ячейке.

На рис. XII.13 представлена схема высших заполненных и низших вакантных состояний электронов полипептидной цепи. Вследствие большой ширины запрещенной зоны прямой переход электрона из валентной зоны белка в зону проводимости невозможен. Это означает, что в обычных условиях белок является диэлектриком и не обладает собственной спонтанной проводимостью.

§ 3. Оптическая активность биополимеров

Биополимеры обладают естественной оптической активностью, т. е. вращают плоскость поляризации проходящего через них света, что происходит вследствие разной скорости распространения поляризованных по кругу вправо и влево компонентов плоскополяризованного луча. Вращение плоскости поляризации зависит от длины волны. Это явление называется дисперсией оптического вращения (ДОВ). Другое явление — круговой дихроизм (КД) — состоит в разном поглощении право- и левополяризованных по кругу компонентов плоскополяризованной волны и обнаруживается только при определенных длинах волн в спектрах поглощения. Плоскополяризованная волна, проходя через среду, которая обладает разными показателями преломления ($n_L \neq n_D$) для лево- (n_L) и право- (n_D) поляризованных по кругу компонентов, будет характеризоваться неким углом (α) поворота результирующей плоскости поляризации:

$$\alpha = (\pi/\lambda)(n_L - n_D), \quad (\text{XII.3.1})$$

где α — угол поворота в радианах на 1 см пути (рис. XII.14).

Так, при $\lambda = 314$ нм разность показателей преломления ничтожна: $n_L - n_D \approx \approx 10^{-5}$, а угол вращения составляет 1 рад (57°) на 1 см. пути. На практике часто используют величины удельного вращения $[\alpha]_{\text{уд}}$ и молярного вращения $[m]_{\text{м}}$:

$$[\alpha]_{\text{уд}} = \alpha / (lc); \quad (\text{XII.3.2})$$

$$[m]_{\text{м}} = [\alpha]_{\text{уд}} M / 100, \quad (\text{XII.3.3})$$

где α — вращение раствора, град; l — длина пути света в растворе, дм; c — концентрация вещества, г/см³; M — молекулярная масса.

Если измерения поглощения проводятся в оптически активной полосе поглощения, то возникает круговой дихроизм, степень которого определяется разностью коэффициентов экстинкции для лево- и правополяризованной по кругу световой волны:

$$\Delta \epsilon = \epsilon_L - \epsilon_D, \quad (\text{XII.3.4})$$

где ϵ — молярный коэффициент экстинкции с размерностью л·моль⁻¹·см⁻¹. КД проявляется за счет того, что плоскополяризованная волна монохроматического света, проходя через оптически активную среду, где ее компоненты поглощаются по-разному, превращается в эллиптически поляризованную волну (рис. XII.15). Одновременно при сложении этих разных компонентов происходит и вращение плоскости поляризации на угол α . Мерой эллиптичности служит величина Θ :

$$\Theta = (\pi/\lambda)(\epsilon_L - \epsilon_D), \quad (\text{XII.3.5})$$

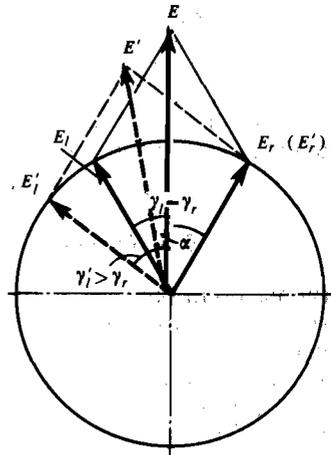
где Θ — угол, тангенс которого равен отношению малой и большой полуосей эллипса поляризации.

Молярная эллиптичность определяется как

$$\Theta_M = 3300(\epsilon_L - \epsilon_D). \tag{XII.3.6}$$

Рис. XII.14.

Возникновение вращения плоскости поляризации (α) за счет кругового двойного лучепреломления



Если векторы E и E_1 передвигаются по кругу вправо и влево с одинаковой скоростью ($V_o = \gamma_r = \gamma_l$ в любой момент времени), то независимо от величины векторов, результирующий вектор всегда будет лежать в вертикальной плоскости. Если векторы E_r и E_l вращаются с разными скоростями ($\gamma_r \neq \gamma_l$), то результирующий вектор оказывается в плоскости, повернутой по отношению к вертикальной на некоторый угол α , т. е. происходит вращение плоскости поляризации плоскополяризованной монохроматической волны

Таким образом, КД всегда будет приводить к вращению плоскости поляризации при длинах волн в полосе дихроичного поглощения. Вдали от полос дихроичного поглощения ДОВ следует закону

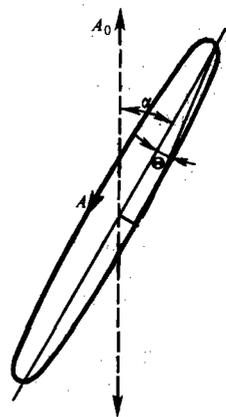
$$[\alpha]_{уд} = \sum_k \frac{A_k}{\lambda^2 - \lambda_k^2}, \tag{XII.3.7}$$

где λ — длина волны падающего света; A_k — постоянная, зависящая от свойств k -го электронного перехода с длиной волны λ_k и определяющая его вклад в общее вращение плоскости поляризации. Вращение плоскости поляризации наблюдается в случае двух связанных осцилляторов, которые вместо собст-

Рис. XII.15.

К возникновению эллиптичности

Плоскополяризованная монохроматическая волна A_0 , изображенная на чертеже как след на плоскости от колебаний электрического вектора и имеющая длину волны, соответствующую полосе поглощения анизотропной среды, проходя через эту среду, становится эллиптически поляризованной (A) и характеризуется углом θ (эллиптичность) и величиной угла вращения плоскости поляризации α



венной частоты ω_0 характеризуются из-за взаимодействия частотами ω_1 и ω_2 (см. § 1 гл. VIII; рис. VIII.3).

В этом случае вместо (XII.3.7) справедливо выражение

$$[\alpha]_{\omega} = \omega^2 \sum_k \frac{R_k}{\omega_k^2 - \omega^2}, \quad (\text{XII.3.8})$$

где R_k — вращательная сила k -го перехода. Очевидно, $A_k = R_k \lambda_k^2$.

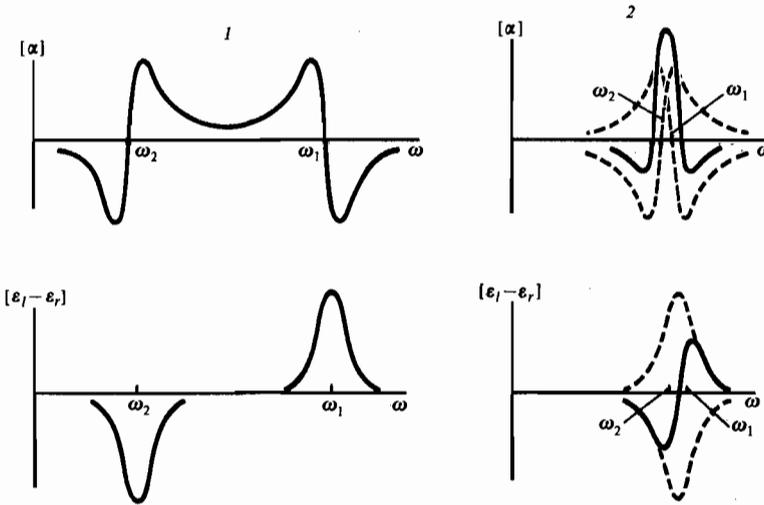


Рис. XII.16.

Дисперсия оптического вращения α и круговой дихроизм $(\epsilon_l - \epsilon_r)$ для случая двух взаимодействующих осцилляторов, обладающих одинаковыми собственными частотами

В зависимости от характера взаимодействия расщепление собственной частоты на две (ω_1 и ω_2) может быть сильным (I) или слабым (II)

На рис. XII.16 приведены кривые КД и ДОВ; видно, что кривая ДОВ — производная от кривой КД, что действительно указывает на существование связи между этими оптическими явлениями. В строгой квантово-механической теории раскрывается связь между поворотом плоскости поляризации и строением оптически активных молекул. Вращательная сила k -го индивидуального перехода выражается как

$$R_k = I_m (\mathbf{d}_e^k \mathbf{d}_m^k), \quad (\text{XII.3.9})$$

где I_m — мнимая часть скалярного произведения электрического (\mathbf{d}_e) и магнитного (\mathbf{d}_m) моментов перехода. Очевидно, что для проявления оптической активности электронный переход в молекуле при поглощении света должен сопровождаться изменением распределения электрических зарядов, что и приводит к появлению электрического переходного диполя (\mathbf{d}_e).

Вращение заряда вокруг оси возбуждает магнитный момент вдоль оси и создает магнитный диполь (\mathbf{d}_m). В биополимерах $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходы являются электрически разрешенными переходами, для которых $\mathbf{d}_e \neq 0$, а $\mathbf{d}_m = 0$. Наоборот, $n \rightarrow \pi^*$ -переход магнитно разрешен: $\mathbf{d}_m \neq 0$ ($\mathbf{d}_e = 0$), поскольку при этом меняется симметрия орбиталей и создается вращение зарядов вокруг оси. При одновременном осуществлении в молекуле $n \rightarrow \pi$ - и $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходов волновые функции, описывающие возбужденные состояния при этих переходах, смеси-

ваются. Вследствие этого $n \rightarrow \pi^*$ -переход помимо \mathbf{d}_m приобретает и \mathbf{d}_e , а $\pi \rightarrow \pi^*$ -переход помимо \mathbf{d}_e приобретает и \mathbf{d}_m . Поэтому в системе одновременно отличны от нуля \mathbf{d}_e и \mathbf{d}_m , что и является условием оптической активности (XII.3.9).

В спиральных структурах (π -спирали) электроны отдельных хромофоров могут быть делокализованы в соответствии со спиральным расположением хромофоров. Вследствие экситонного взаимодействия возбуждение делокализовано по всей спиральной структуре, т. е. спиральная конформация молекулы в целом является оптически активной, поскольку при этом в ней одновременно возникают и \mathbf{d}_e , и \mathbf{d}_m .

Важно, что во всех случаях величины R_k сильно зависят от конформации молекул, на чем и основано использование явления оптической активности для конформационного анализа биополимеров.

Оптическая активность биополимеров, естественная и возникающая под влиянием магнитных полей, более подробно рассматривается в специальных руководствах.

Глава XIII

Механизмы переноса электрона и миграции энергии в биоструктурах

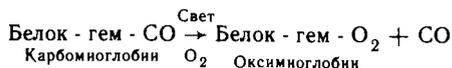


Молекулярные механизмы биологических процессов во многом обусловлены электронными свойствами макромолекул. Как было показано, изменение электронного состояния одного участка (активный центр) белка дает начало последовательным и направленным конформационным превращениям, захватывающим большие области в макромолекуле (см. § 1 гл. X). Теперь будут рассмотрены физические механизмы процессов трансформации электронной энергии в биоструктурах. Особое значение в биологических процессах имеют миграция энергии электронного возбуждения и транспорт электронов.

§ 1. Биологические примеры

Миграция энергии электронного возбуждения. Это явление давно было обнаружено в растворах люминесцирующих красителей. Оно осуществляется по общей схеме $D^* + A \rightarrow D + A^*$, где D^* и A — соответственно молекулы донора и акцептора энергии. Здесь происходит безызлучательный обмен энергией между электронно-возбужденной молекулой донора D^* и молекулой акцептора A в основном состоянии. Сама по себе миграция энергии не сопровождается химическими изменениями молекул, а представляет собой чисто физический процесс. Перенос возбуждения сопровождается сокращением длительности возбужденного состояния и квантового выхода люминесценции молекул донора, для которого молекулы акцептора выступают в роли тушителей (см. (X. 2.8); (X.2.10)). Одновременно происходит и деполяризация флуоресценции A при переносе энергии от D в системе хаотически распределенных молекул.

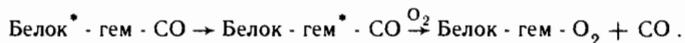
Одним из первых сообщений о миграции энергии электронного возбуждения в белке были опыты по фотодиссоциации карбомиоглобина — комплекса СО-миоглобина (А. Касперс, М. Бюхнер, 1947). Под действием света в присутствии кислорода происходило отщепление СО от карбомиоглобина с образованием оксимиоглобина:



Разрыв связи гем-СО происходит вследствие фотодиссоциации или распада этого соединения в возбужденном состоянии. Энергии поглощенного кванта света оказывается достаточно не только для перевода молекулы в возбужденное состояние, но и повышения запаса ее колебательной энергии на величину, превышающую глубину минимума потенциальной кривой $U^*(R)$ возбужденного состояния (см. рис. X.4).

Фотохимическая реакция отщепления СО от гема вызывается светом, поглощенным гемом, и достаточно эффективна при длинах волн около 410 нм.

Однако, кроме того, в области 280 нм, где до 40% энергии поглощают ароматические группы белка, возбуждение приводит к такому же эффективному распаду связи гем-СО. Это свидетельствует о миграции энергии от белка на гем. Затем эта энергия растрчивается на фотохимическое отщепление оксида углерода:



Таким образом, показан перенос энергии электронного возбуждения между различными группами в белковой молекуле. Позднее перенос энергии возбуждения был обнаружен на комплексах белка с красителем — хромофором (диметиламиноафтол-сульфохлорид). Было показано, что возбуждение люминисценции хромофорной группы вызывается квантами, поглощенными белковой частью хромопротеинов.

В других опытах оказалось, что присоединение акридинового красителя к молекуле ДНК повышает ее устойчивость к действию ультрафиолетовых лучей. Энергия возбуждения молекулы ДНК в этом случае передается на краситель и высвечивается в виде его флуоресценции, а не тратится на фотохимический процесс повреждения ДНК.

Один из наиболее важных процессов миграции энергии осуществляется в фотосинтезе. Здесь происходит перенос энергии от фикозеритрина и фикоцианина на хлорофилл в направлении реакционного центра, где происходит первичный акт фотосинтеза (подробнее см. гл. XXVII). Электронная энергия может переноситься в биологических системах и в процессе транспорта электронов по общей схеме $D^- + A \rightarrow D + A^-$.

Перенос электрона. Транспорт электрона может происходить на относительно большие расстояния и независимо от поступательных движений молекул донора и акцептора электрона. Это отличает эти процессы от окислительно-восстановительных реакций в растворе.

В физике хорошо известна полупроводниковая модель миграции электрона на большие межмолекулярные расстояния по зоне проводимости в кристаллической решетке. В этой модели молекулы D и A могут занимать уровни соответственно донорной и акцепторной примесей. Несмотря на привлекательность, полупроводниковая концепция не получила подтверждения в биологических системах. Существующие модификации полупроводниковой модели будут рассмотрены ниже (см. § 6 гл. XIII). В настоящее время наибольшее внимание в этой области привлекает к себе концепция туннельного транспорта электрона между отдельными белковыми молекулами-переносчиками, отделенными друг от друга энергетическими барьерами. Туннельный перенос происходит в условиях, когда значение энергии электрона меньше высоты энергетического барьера между молекулами D и A . Этот эффект имеет чисто квантово-механическую природу. Одной из характеристик туннельного переноса является его осуществление при расстояниях между донором и акцептором порядка $0,5^{-1}$ нм.

Важнейшая особенность подбарьерного переноса электрона по туннельному механизму состоит в том, что он может происходить и при низких температурах (температуры жидкого азота 77 К и ниже). В этих условиях поступательные движения больших белковых молекул замедлены и, следовательно, обычные физико-химические механизмы реакций в растворах по типу сталкивающихся частиц, обладающих избытком кинетической энергии, заведомо не могут осуществляться с высокой скоростью. Таким образом, туннельный механизм может обеспечить перенос электронов в условиях, когда «не работают» аррениусовские активационные механизмы реакций, что не исключает эффективного

туннелирования электронов и при нормальных температурах, успешно конкурирующего с обычными «активационными» реакциями.

Низкомолекулярная окислительно-восстановительная реакция переноса электрона. Описываемая реакция впервые была обнаружена в пурпурных фотосинтезирующих бактериях. Она состоит в переносе электрона от молекулы цитохрома *c* к молекуле бактериохлорофилла, возбужденной квантом света, и может идти при температурах жидкого азота (Б. Чанс, 1960). Оказалось,

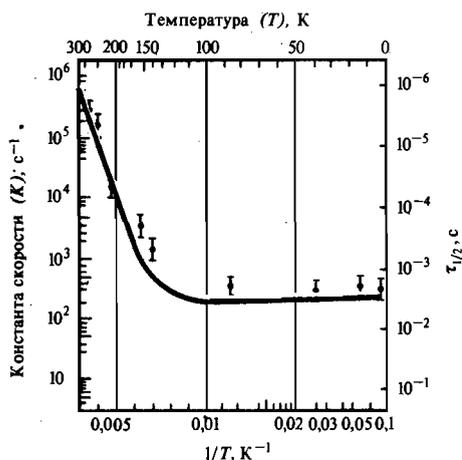
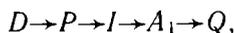


Рис. XIII.1. Температурная зависимость скорости окисления цитохрома в фотосинтезирующих бактериях (по Don Devault, 1980)

С понижением температуры от комнатной до 140 К константа скорости уменьшается на три порядка, а затем остается неизменной вплоть до температуры жидкого гелия

что скорость окисления цитохрома в бактериях *Chromatium* не зависит от температуры в диапазоне 100—4 К (Д. Де Во, Б. Чанс, 1966) и идет с характерным временем $\tau_{1/2} \sim 2,3 \cdot 10^{-3}$ с в этом температурном диапазоне (рис. XIII.1). Кривая температурной зависимости носит двухфазный характер. Очевидно, что чисто безактивационное туннелирование преобладает при $T < 100$ К. При более высоких температурах процессы, требующие активации, становятся уже конкурентоспособными.

В последние годы накоплен большой экспериментальный материал о низкотемпературных стадиях переноса электрона в фотосинтетических реакционных центрах (РЦ). Общая схема переноса в РЦ фотосинтезирующих бактерий имеет вид



где *D* — первичный донор (цитохром); *P* — фотоактивный пигмент (димер бактериохлорофилла); *I* — промежуточный акцептор (бактериофеофитин); *A*₁ — первичный акцептор (комплекс хинона с железосодержащим белком); *Q* — вторичный акцептор (хинон). Эти переносчики образуют макромолекулярные комплексы с белком РЦ, который погружен в фотосинтетическую мембрану. Реакции транспорта электрона в РЦ не связаны с существенными перемещениями переносчиков (за исключением вторичного хинона). Тем не менее они протекают и при низких температурах со значительными скоростями. Характерные времена переноса электрона при 77 К составляют на отдельных участках цепи 10^{-5} с (*D*→*P*); $\sim 5 \cdot 10^{-12}$ с (*P*→*I*); $\sim 10^{-10}$ с (*I*→*A*₁); $\sim 10^{-3}$ с (*A*₁→*Q*). Близкие значения получаются и в препаратах высших растений (подробнее см. гл. XXVII, XXVIII).

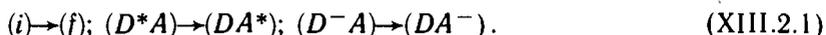
Туннельный перенос электрона. Он не требует крупномасштабных перемещений целых молекул, однако сопровождается изменением равновесной ядерной конфигурации системы вследствие изменения зарядов состояния молекул и перехода системы на другую поверхность потенциальной энергии. В фотосинтетических РЦ это проявляется в виде зависимости характера переноса от конформационного состояния белковых компонентов РЦ. В митохондриях отсутствуют низкотемпературные реакции переноса электрона. Вместе с тем большие скорости переноса ($\tau_{1/2} \sim 10^{-3} \div 10^{-6}$ с) на отдельных участках дыхательной цепи показывают, что и здесь имеет место туннельный перенос. В митохондриях этот перенос также сопряжен с конформационными изменениями белковых компонентов. По различным оценкам, расстояния между активными протестическими группами переносчиков, непосредственно передающих электрон, составляют не меньше 0,5—1 нм (для цитохромов c и b_5 в реакции переноса электрона между ними оно составляет 0,8 нм).

Аналогичные данные получаются и при оценке расстояний, на которые проникает электрон от поверхности внутрь молекулы белка в его реакциях с неорганическими реагентами. В области низких температур, где перенос электрона практически не зависит от температуры, соответствующая перестройка ядерной системы, о которой упоминалось выше, должна происходить также безактивационно. Это означает, что изменение ядерной конфигурации происходит также за счет туннелирования через барьер, образованный пересечением потенциальных поверхностей.

В предыдущих главах было показано, что ядерная система макромолекул характеризуется широким набором различных видов внутримолекулярных движений. Проблема, которую предстоит рассмотреть в этой главе, состоит в том, каким образом при электронном переходе, включающем перенос электрона или миграцию энергии электронного возбуждения, осуществляется взаимодействие с колебательными степенями свободы. Понимание этой проблемы необходимо также для рассмотрения механизма электронно-конформационных взаимодействий, лежащих в основе функционирования биомолекул.

§ 2. Переходы в двухуровневой системе

Пусть в исходном состоянии молекулы донора и акцептора в системе DA являются электронейтральными и находятся в основном электронном состоянии. Будем считать, что потенциальная энергия системы не зависит от времени и исходная система пребывает в стационарном состоянии (i). В результате возбуждения молекулы донора или присоединения к ней электрона от внешнего источника система оказывается в нестационарном состоянии. При этом за счет взаимодействий между донором и акцептором совершаются переходы между начальными (i) и конечными (f) состояниями согласно схеме



Переходы $i \rightarrow f$ могут сопровождаться и перестройкой равновесной ядерной конфигурации в системе (DA). Проблема состоит в том, чтобы найти зависимость вероятности перехода от характера взаимодействия, параметров системы, а также от внешних условий (температура). Будем считать в простейшем случае, что молекулы донора и акцептора представляют собой потенциальные «ямы», разделенные энергетическим барьером. В каждой из них имеется свой набор дискретных состояний, характеризуемый волновыми функциями электрона и уровнями его возбуждения. Рассмотрим простейший случай, когда D и A представляют собой, например, два одинаковых атома с двумя уровнями энергии (рис. XIII.2). Пусть состояния донора и акцептора описываются

волновыми функциями φ_D и φ_A в нижнем невозбужденном состоянии. Соответственно верхним состояниям отвечают функции $\varphi_D^1(x_1)$ и $\varphi_A^1(x_2)$, где x_1 и x_2 — координаты электронов в D и A . Допустим, что в начальный момент $t=0$ система находилась в состоянии (D^1A) с волновой функцией

$$\Psi_i = \varphi_D^1 \varphi_A. \quad (\text{XIII.2.2})$$

В результате взаимодействия между донором D^1 и акцептором A может произойти переход в состояние, которое приближенно может быть описано волновой функцией

$$\Psi_i = \varphi_D \varphi_A^1. \quad (\text{XIII.2.3})$$

В случае же переноса электрона одноэлектронная функция Ψ_i описывает начальное состояние (D^-A) , когда электрон локализован на доноре, а Ψ_j соответствует состоянию (DA^-) . Найдем вероятность перехода между состояниями i и j . Согласно принципу суперпозиции (см. (XII.1.25)), в двухуровневом приближении полная волновая функция системы (DA) имеет вид

$$\Psi = C_i(t)\Psi_i + C_j(t)\Psi_j, \quad (\text{XIII.2.4})$$

где коэффициенты $C_i(t)$, $C_j(t)$ зависят от времени, а квадраты их модуля определяют вероятности нахождения в соответствующих состояниях i и j . Исходное состояние системы в отсутствие взаимодействия D и A должно описываться волновыми функциями Ψ_i и Ψ_j , зависимость от времени которых имеет вид (XII.1.11):

$$\Psi_i = \Psi_i^0 e^{-i \frac{E_i}{\hbar} t} = \Psi_i^0 e^{-i \omega_i t}; \quad (\text{XIII.2.5})$$

$$\Psi_j = \Psi_j^0 e^{-i \frac{E_j}{\hbar} t} = \Psi_j^0 e^{-i \omega_j t}.$$

Для нахождения коэффициентов $C_i(t)$ и $C_j(t)$ при наличии взаимодействия надо решить нестационарное уравнение Шредингера (см. (XII.1.10)). Общая энергия рассматриваемой системы в отличие от изолированных молекул D и A включает теперь энергию их взаимодействия U , и полный Гамильтониан (см. (XII.1.8)) имеет вид $\hat{H} = \hat{H}_0 + \hat{U}$. (XIII.2.6)

Вместо (XII.1.10) имеем

$$i\hbar \frac{\partial \Psi}{\partial t} = (\hat{H}_0 + \hat{U})\Psi. \quad (\text{XIII.2.7})$$

Подставляя (XIII.2.5) в (XIII.2.7) можно получить два уравнения для нахождения коэффициентов $C_i(t)$ и $C_j(t)$. Полагаем $\omega_i = \omega_j$:

$$i\hbar \frac{\partial C_i}{\partial t} = V_{ij} C_j; \quad i\hbar \frac{\partial C_j}{\partial t} = V_{ji} C_i, \quad (\text{XIII.2.8})$$

где V_{ij} — матричный элемент энергии взаимодействия, равный

$$V_{ij} = \int \Psi_i^* \hat{U} \Psi_j dt \quad (\text{XIII.2.9})$$

и зависящий, как видно, от перекрытия волновых функций исходного и конечного состояний.

Решение уравнений (XIII.2.7) позволяет определить $|C_i|^2$ и $|C_j|^2$, т. е. вероятность найти систему в состояниях Ψ_i и Ψ_j при начальных условиях

$$C_i(0) = 1, C_f(0) = 0. \text{ Полагая } V_{if} \text{ не зависящим от времени, получим из (XIII.2.8)}$$

$$|C_i(t)|^2 = \cos^2(|V_{if}|t/\hbar); |C_f(t)|^2 = \sin^2(|V_{if}|t/\hbar). \quad (\text{XIII.2.10})$$

Отсюда видно, что в двухуровневой системе с резонансными уровнями происходят квантово-механические колебания между состояниями i и f или обмен электроном между D и A с частотой $2|V_{if}|/\hbar$, пропорциональной первой степени энергии взаимодействия (аналогично решается задача и об обмене энергией между D и A). Решение более общей задачи при $\omega_i \neq \omega_f$ приводит к сходному результату. При этом оказывается, что амплитуда колебаний в (XIII.2.10) остается порядка единицы, если осуществляется условие

$$|\omega_i - \omega_f| \leq V_{if}/\hbar. \quad (\text{XIII.2.11})$$

Это означает, что условие резонанса сохраняется, если уровни энергии начального и конечного состояний $E_i = \hbar\omega_i$ и $E_f = \hbar\omega_f$ совпадают с точностью до энергии взаимодействия, вызывающего переход. Если

$$|\omega_i - \omega_f| \gg V_{if}/\hbar, \quad (\text{XIII.2.12})$$

то амплитуда колебания $|C_f|^2$ становится порядка $|V_{if}|^2/\hbar^2(\omega_i - \omega_f)^2 \gg 1$ и перехода $i \rightarrow f$ практически не происходит.

Таким образом, в системе двух дискретных уровней даже при наличии резонанса не может осуществляться истинный необратимый перенос энергии или электрона. Здесь возникают квантово-механические колебания между состояниями i и f , что не позволяет четко фиксировать в акцепторе энергию возбуждения или электрон. Между тем именно в этом должен состоять результат процесса взаимодействия донора с акцептором в реальных условиях, когда перенос осуществляется необратимо: Для обеспечения необратимости переноса необходимо, очевидно, включение каких-то диссипативных процессов, в ходе которых рассеивается часть энергии возбуждения (электрона) за время пребывания в акцепторе. Если это приведет к «расстройке» резонанса уровней (XIII.2.11) в акцепторе и доноре за время, меньшее $\hbar/2|V_{if}|$, то обратный перенос от акцептора к молекуле донора станет практически невозможным; следовательно, необратимость перехода обусловлена связью между рассматриваемой динамической (электронной) и диссипативной системами.

§ 3. Туннельный эффект

Механизмы. Физические представления, связанные с задачей туннелирования электронов или ядер, являются весьма важными для дальнейшего изложения. Пусть, например, электрон находится в области I (рис. XIII.3), где его энергия E меньше, чем энергия потенциального барьера U_0 , отделяющего область I от области II . Требуется найти вероятность того, что электрон преодолет область II , т. е. пройдет сквозь потенциальный барьер. Согласно классической физике, эта вероятность равна нулю, так как $E < U_0$ и в области II кинетическая энергия электрона должна быть отрицательна, что невозможно. В квантовой механике движение электрона описывается волновой функцией $\Psi(x, t)$, которая, подобно плоской волне, падающей на потенциальный барьер U_0 в точке $x = x_0$, частично отражается, а частично проходит сквозь него.

Рассмотрим этот эффект подробнее. Напишем стационарные уравнения Шредингера для областей I и II :

$$-\frac{\hbar}{2m} \frac{d^2\Psi_1(x)}{dx^2} = E\Psi_1(x); \quad -\frac{\hbar}{2m} \frac{d^2\Psi_2(x)}{dx^2} = (E - U_0)\Psi_2(x), \quad (\text{XIII.3.1})$$

где $\Psi_1(x)$ и $\Psi_2(x)$ определяют волновую функцию стационарного состояния с энергией E .

Обозначим

$$k_1 = \sqrt{2mE} / \hbar = mV_1 / \hbar = 2\pi / \lambda_1;$$

$$k_2 = \sqrt{2m(E - U_0)} / \hbar = mV_2 / \hbar = 2\pi / \lambda_2, \quad (\text{XIII.3.2})$$

где k_1, k_2 — волновые векторы; λ_1, λ_2 — длины волн в областях I и II .

В этих обозначениях система (XIII.3.1) выглядит как

$$\frac{d^2 \Psi_1(x)}{dx^2} + k_1^2 \Psi_1(x) = 0;$$

$$\frac{d^2 \Psi_2(x)}{dx^2} + k_2^2 \Psi_2(x) = 0. \quad (\text{XIII.3.3})$$

В общем виде для областей I и II каждая из функций Ψ_1, Ψ_2 может быть представлена в виде суммы экспонент $e^{\pm ik_1 x}$, $e^{\pm ik_2 x}$. Присоединив к каждому из этих частных стационарных решений временной множитель $e^{-iEt/\hbar} = e^{-i\omega t}$ (см. (XII.1.11)), получим $e^{i(xk - \omega t)}$, что соответствует распространению плоской волны. Волновая функция системы и ее первая производная должны быть непрерывны во всей области движения. Следовательно, функции $\Psi_1(x)$ и $\Psi_2(x)$ должны «гладко сшиваться» на границе областей I и II . Условие сшивки имеет вид

$$\Psi_1(x_0) = \Psi_2(x_0);$$

$$\left. \frac{d\Psi_1}{dx} \right|_{x=x_0} = \left. \frac{d\Psi_2}{dx} \right|_{x=x_0}. \quad (\text{XIII.3.4})$$

В области I

$$\Psi_1(x) = A_1 e^{ik_1 x} + B_1 e^{-ik_1 x}, \quad (\text{XIII.3.5})$$

где $e^{ik_1 x}$ соответствует волне, набегающей по оси x на барьер слева — направо, а $e^{-ik_1 x}$ описывает отраженную от барьера волну.

В области II при $(E - U_0) < 0$ коэффициент k_2 становится чисто мнимым $k_2 = ik$, где $k = \sqrt{2m(U_0 - E)} / \hbar$. Отсюда решение уравнения Шредингера для области II приобретает вид

$$\Psi_2 = A_2 e^{-ik_2 x} + B_2 e^{ik_2 x} = A_2 e^{kx} + B_2 e^{-kx}; \Psi_2 = B_2 e^{ik_2 x} = B_2 e^{-kx}. \quad (\text{XIII.3.6})$$

При достаточной ширине барьера в силу граничных условий можно пренебречь растущей экспонентой $A_2 e^{kx}$. Иными словами, существует вполне определенная вероятность найти частицу в точке x , классически недоступной области II , которая равна (см. (XII.1.3))

$$|\Psi_2|^2 = B_2^2 e^{-2kx} = B_2^2 e^{-2x \sqrt{2m(U_0 - E)} / \hbar}. \quad (\text{XIII.3.7})$$

Если, например, высота барьера $U_0 - E = 1$ эВ, то относительная вероятность найти электрон на расстоянии x от границы барьера в области II убывает экспоненциально с показателем

$$\frac{2}{\hbar} \sqrt{2m(U_0 - E)} x = \frac{1}{1,05 \cdot 10^{-27}} = 1,87 \cdot 10^{-27} \cdot 1,6 \cdot 10^{-12} x = 1,045 \cdot 10^8 x.$$

На расстоянии $x=0,1$ нм $e^{-1,045}=0,29$. Как видно, при $x=0,1$ нм относительная вероятность составляет около 30%, что представляется вполне значительной величиной.

Рассмотрим случай, когда классически разрешенные области электрона разделены барьером. Ограничимся ситуацией, изображенной на рис. XIII.4, когда область III бесконечна и отделена от области I барьером конечной

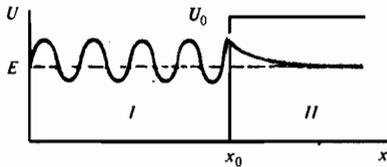


Рис. XIII.3. Проникновение электрона под потенциальный барьер высотой U_0 из области I в область II

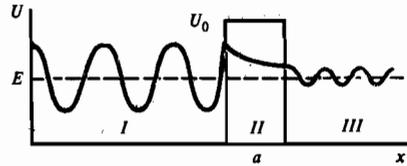


Рис. XIII.4. Тунnelирование электрона через конечный потенциальный барьер U_0 из области I в область III; a — ширина барьера

ширины и высоты. Используя условия сшивки, аналогичные (XIII.3.4), можно определить вероятность T нахождения электрона в области III, которая пропорциональна $|\Psi_a|^2$ и при $ka \gg 1$ составляет

$$T = e^{-2ka} = e^{-2a\sqrt{2m(U_0-E)}/\hbar} \quad (\text{XIII.3.8})$$

где a — ширина, (U_0-E) — высота барьера.

Величина T определяет прозрачность барьера. Если электрон совершает осцилляторные движения в потенциальной «яме», ударяясь с определенной частотой (ω) о ее стенки, то можно показать, что вероятность его выхода из «ямы» в единицу времени будет равна (формула Гамова)

$$W_0 = \omega T \quad \text{или} \quad W_0 = \omega e^{-2a\sqrt{2m(U_0-E)}/\hbar} \quad (\text{XIII.3.9})$$

Затухание состояний. Зависимость от времени волновой функции стационарного электрона в «яме» определится как (см. (XII.1.11))

$$\Psi(x,t) = \Psi(x) e^{-iEt/\hbar} = \Psi(x) e^{-i\omega t}$$

Однако при учете процессов распада вероятность найти электрон в «яме» должна экспоненциально затухать во времени, т. е. волновая функция в этом случае должна иметь вид

$$\Psi_1(x,t) = \Psi_1(x) e^{-iEt/\hbar} \cdot e^{-W_0 t/2} \quad (\text{XIII.3.10})$$

или

$$|\Psi_1(x,t)|^2 \sim e^{-W_0 t} \quad (\text{XIII.3.11})$$

Согласно соотношению неопределенностей для энергии (см. (X.2.20)) естественная ширина энергетического уровня (Γ) электрона в «яме» связана с его временем жизни в ней ($\tau=1/W_0$) как

$$\tau\Gamma \sim \hbar. \quad (\text{XIII.3.12})$$

Таким образом, рассматриваемое квазистационарное состояние электрона

обладает некоторой средней энергией E_0 при ширине уровня, определяемого скоростью распада W_0 .

Выражению (XIII.3.10) можно придать форму, формально соответствующую стационарному состоянию, введя комплексную энергию \tilde{E} , мнимая часть которой характеризует скорость распада, или размытость уровня около среднего значения E_0 :

$$\tilde{E} = E_0 - i\hbar W_0/2 = E_0 - i\Gamma/2. \tag{XIII.3.13}$$

Тогда, аналогично (XII.1.11), имеем

$$\Psi(x,t) = \Psi(x) e^{-i\tilde{E}t/\hbar}. \tag{XIII.3.14}$$

Использование комплексной энергии \tilde{E} вместо энергии уровня E_0 позволяет автоматически учитывать квазистационарность состояний или наличие диссипативных процессов при вычислении вероятностей переходов. В случае диссипативных процессов дискретный уровень с энергией E_0 размывается в зону, характеризуемую функцией распределения плотности уровней в квазистационарном состоянии $\rho(E)$. Величина $\rho(E)dE$ есть вероятность того, что энергия системы в состоянии $\Psi(x)$ имеет значения, лежащие в интервале от E до $(E + dE)$. Плотность уровней $\rho(E)$ непосредственно связана с законом затухания. В случае экспоненциального затухания $\rho(E)$ представляет собой распределение Лоренца с шириной, пропорциональной скорости распада:

$$\rho(E) = \frac{\Gamma / (2\pi)}{(E - E_0)^2 + \Gamma^2 / 4} = \frac{W_0 / (2\pi)}{(\omega - \omega_0)^2 + W_0^2 / 4}. \tag{XIII.3.15}$$

На рис. XIII.5 изображен контур спектральной линии, форма которого задается выражением (XIII.3.15). Максимальная плотность состояний соответствует средней энергии системы $E_0 = \hbar\omega_0$. При $\Gamma \rightarrow 0$ $\rho(E) \rightarrow \delta(E - E_0)$, где $\delta(E - E_0)$ — δ -функция Дирака, принимающая нулевое значение везде, где $E \neq E_0$. При $E - E_0 = 0$ δ -функция расходится, а интеграл от нее, содержащий точку $E - E_0 = 0$, равен единице, т. е.

$$\begin{cases} \delta(E - E_0) = 0 & \text{при } E \neq E_0; \\ \int \delta(E - E_0) dE = 1 & \text{при } E - E_0 = 0. \end{cases} \tag{XIII.3.16}$$

Иными словами, $\delta(E - E_0)$ есть плотность состояний для дискретного уровня с энергией E_0 .

§ 4. Переходы в двухуровневой системе при наличии диссипативных процессов

Рассмотрим вновь процесс переноса между двумя состояниями, разделенными потенциальным барьером (см. рис. XIII.2). Как было показано, в такой системе при отсутствии диссипативных процессов совершаются квантово-механические колебания между двумя состояниями Ψ_i и Ψ_j . Однако если конечное состояние является квазистационарным в силу определенных диссипативных процессов и характеризуется комплексной энергией (XIII.3.13) $\tilde{E}_j = \omega_j - i\Gamma_j/2$, то решение системы уравнений, аналогичной (XIII.2.8), показывает, что процесс перехода из начального в конечное состояние имеет необратимый характер. Это означает, что можно ввести вероятность перехода в единицу времени W_{ij} , которая определяется формулой («золотое» правило Ферми)

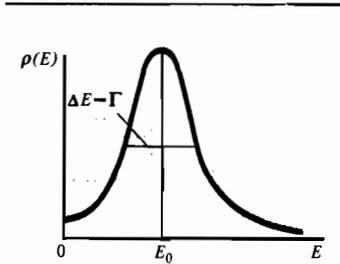


Рис. XIII.5. Лоренцевская форма спектральной линии (объяснение см. в тексте)

$$W_{ij} = 2\pi |V_{ij}|^2 \rho_f(E_i) / \hbar. \quad (\text{XIII.4.1})$$

Таким образом, вероятность перехода между состояниями Ψ_i и Ψ_j пропорциональна квадрату матричного элемента (см. (XIII.2.8))

$$V_{ij} = \langle \Psi_i | \hat{V} | \Psi_j \rangle = \int \Psi_i^* \hat{V} \Psi_j d\tau \quad (\text{XIII.4.2})$$

и плотности уровней в конечном состоянии ρ_f при энергии, равной E_i . Величина $\rho_f(E_i)$ в случае квазистационарного состояния определяется (XIII.3.5), где вместо E_0 нужно взять $\hbar\omega_j$, а вместо $\Gamma - \Gamma_j$.

Рассмотрим, например, туннелирование электрона между D и A и попадание вследствие этого всей системы в конечное состояние Ψ_f , сопровождающееся необратимой диссипацией части энергии или уходом системы из состояния Ψ_j со скоростью W_b (рис. XIII.6). Это означает, что ширина уровня конечного состояния составит $\Gamma_f \sim \hbar W_b$. Уширение уровня может произойти за счет процессов дальнейшего туннелирования электрона через стенки барьера в ближайшее окружение акцептора. Другие процессы, приводящие к уширению уровня E , связаны с влиянием окружающей среды, взаимодействующей с электронами, что приводит к «дрожанию» энергетического уровня и потере когерентности состояний волновой функции $\Psi_i(x,t) = \Psi(x)e^{-i\omega t}$ за счет сбоя фазы колебаний. Уширение электронных уровней в сложных молекулах может достигаться в результате движения ядер и электронно-колебательных взаимодействий, приводящих к потере части электронной энергии по колебательным степеням свободы. Аналогично (X.2.21), общая ширина уровня определится как

$$\Gamma_f \sim 1/(2T_1) + 1/T_2, \quad (\text{XIII.4.3})$$

где T_1 — характерное время дальнейшего туннелирования электрона от акцептора или время релаксации электронной энергии; T_2 — время сбоя фазы за счет движения ядер. Как правило, $T_2 \ll T_1$, поэтому вероятность W_b в основном связана с электронно-колебательными взаимодействиями и колебательной релаксацией в акцепторе (подробнее см. ниже).

Величина электронного матричного элемента V_{ij} при туннельном переходе определяется энергией кулоновского взаимодействия между донором и акцептором (которое убывает с расстоянием L как e^2/L) и перекрытием электронных волновых функций донора и акцептора. Степень перекрытия определяется туннельным фактором T , который убывает экспоненциально как $e^{-2L/b}$ в связи с тем, что

$$V_{ij} \sim \frac{e^2}{L} e^{-L/b}, \quad (\text{XIII.4.4})$$

где b — эффективная длина затухания электронной волновой функции, зависящая от высоты барьера (см. (XIII.3.8)):

$$b = \hbar / \sqrt{2m_e \varepsilon}. \quad (\text{XIII.4.5})$$

Здесь m_e — масса; ε — энергия связи электрона с донором, равная высоте барьера: $\varepsilon = U_0 - E$.

Считая, что для порфириновых молекул высота барьера составляет порядка 2 эВ, можно найти, что величина $V_{ij} \sim 4 \cdot 10^{-4}$ эВ соответствует туннелированию электрона на расстояние $L \sim 0,8$ нм. При расстояниях между D и $A \ll 0,1$ нм барьер практически отсутствует и между донором и акцептором существует сильное

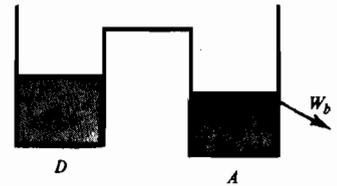


Рис. XIII.6. Туннелирование электрона из начального состояния на метастабильный уровень конечного состояния

взаимодействие. В этом случае волновые функции электрона в соответствиях i и j сильно делокализованы, поэтому в качестве Ψ_i и Ψ_j нужно брать уже не φ_A и φ_D , а соответствующие суперпозиции этих состояний (ср. (XII.1.17)): $\Psi_{ij} = C_{1ij}\varphi_D + C_{2ij}\varphi_A$.

Однако наличие барьера сильно ослабляет взаимодействие V_{ij} между D и A и обуславливает малую степень смешивания состояний φ_D и φ_A . В результате получаем, что в качестве начального и конечного состояний при взаимодействии D и A в отсутствие резонанса уровней нужно брать

$$\varphi_D \sim \varphi_D^0 + \sqrt{T}\varphi_A^0; \quad \varphi_A \sim \varphi_A^0 + \sqrt{T}\varphi_D^0,$$

где φ_A^0, φ_D^0 — невозмущенные волновые функции; $\sqrt{T} \sim e^{-L/b} \ll 1$ — туннельный фактор, ослабляющий смешение волновых функций. При этом максимальная величина (XIII.3.8) сдвига энергетических уровней ΔE_2 , пропорциональная прозрачности барьера T (VIII.3.8), составляет

$$\Delta E_2 \sim Ee^{-L\sqrt{2m(U_0-E)}/\hbar}.$$

При $L \sim 2$ нм, $U_0 - E \sim 2$ эВ расщепление не превышает 10^{-6} эВ. Таким образом, если разность электронных уровней в D и A превышает ΔE_2 , то в качестве Ψ_i и Ψ_j можно брать невозмущенные волновые функции донора и акцептора.

Туннельный перенос для электрона при высоте барьера $e \geq 1$ эВ и $L \sim 0,5$ нм более эффективен, чем надбарьерный активационный процесс не только при низких, но и при обычных температурах. Это легко видеть из отношения туннельного и надбарьерного факторов переноса

$$\frac{e^{-L\sqrt{2me}/\hbar}}{e^{-e/(k_B T)}} > 10,$$

которое справедливо при $T < 700$ К и при указанных выше значениях параметров L и e .

§ 5. Электронно-колебательные взаимодействия в молекулах

Роль движения ядер. До сих пор туннельный перенос электрона рассматривали при неизменных значениях энергетических уровней E_i и E_j . Однако, переходя к рассмотрению механизма этих процессов в реальных молекулах, необходимо также учитывать состояние ядер, при движении которых изменяются энергетические уровни электронов. Ввиду большого различия в массах электроны в молекулах движутся со скоростями, на два-три порядка превышающими скорости движения ядер. Поэтому движение ядер по отношению к движению электрона имеет характер медленно меняющихся внешних условий, к которым электрон успевает «подстраиваться» за время, много меньшее характерного времени движения ядер. Тогда в первом приближении динамику молекулярной системы можно рассматривать как движение электронов в суммарном кулоновском поле ядер, положения которых строго фиксированы в пространстве. При этом электронная энергия U и волновая функция оказываются параметрически зависящими от межъядерных расстояний R . Тогда уравнение Шредингера для электронов имеет вид

$$\hat{H}_e \Phi_k(r, R) = U_k(R) \Phi_k(r, R). \tag{XIII.5.1}$$

Его решение приводит к набору стационарных волновых функций (r — координаты электронов)

$$\Phi_k = \Phi_k(r, R) \tag{XIII.5.2}$$

и соответствующих им собственных значений $U_k(R)$, где k — электронное

квантовое число. Энергия молекулы в этом приближении $U_k(R)$ включает кинетическую энергию всех электронов (T_r), потенциальную энергию кулоновского взаимодействия электронов между собой (U_{rr}), с ядрами (U_{rR}) и ядер друг с другом (U_{RR}).

Разным конфигурациям ядер соответствуют разные электронные энергии $U_k(R)$ при заданном электронном квантовом числе k . Следовательно, функции $U_k(R)$ имеют смысл потенциальной энергии для движения ядер в данном электронном состоянии. Теперь необходимо найти полную энергию молекулы и волновую функцию с учетом движения ядер, совершающих колебания в потенциальном поле $U_k(R)$, которое называется также электронным термом.

Уравнение Шредингера для определения энергии всей молекулы и волновых функций ядер, движущихся в поле $U_k(R)$, имеет вид

$$[\hat{T}_R + \hat{U}_k(R)] \chi_{k,n}(R) = E_{k,n} \chi_{k,n}(R). \quad (\text{XIII.5.3})$$

Из (XIII.5.3) следует, что полная энергия молекулы $E_{k,n}$ зависит от электронного квантового числа k и колебательного квантового числа n . Она включает потенциальную (электронная) энергию молекулы $U_k(R)$ и кинетическую энергию ядер T_R . Волновая функция $\chi_{k,n}(R)$ описывает колебания ядер для данного (k -го) электронного термина $U_k(R)$ и зависит соответственно от квантовых чисел, определяющих как электронное (k), так и ядерное (n) состояния молекулы. Квантовый характер движения ядер приводит к тому, что колебательная энергия молекулы меняется скачками. Величина $\hbar\omega$, соответствующая расстояниям между колебательными подуровнями, называется колебательным квантом. На изображенном рис. X.4 электронном терме $U_k(R)$ нанесены горизонтальные линии, соответствующие колебательным подуровням ядер. В пределах одного электронного термина в гармоническом приближении колебательная энергия зависит от номера уровня n (n называется также колебательным квантовым числом):

$$E_n = (n + 1/2)\hbar\omega. \quad (\text{XIII.5.4})$$

Уровень с $n=0$ называется нулевым или основным состоянием. Энергия основного состояния $E_{\text{кол}} = 1/2\hbar\omega$ (ср. (VIII.1.8)). Полная волновая функция молекулы в рассмотренном приближении Борна — Оппенгеймера имеет вид

$$\Psi_{k,n}(r, R) = \Phi_k(r, R) \chi_{k,n}(R). \quad (\text{XIII.5.5})$$

Электронные переходы. Между начальным Ψ_i и конечным Ψ_f состояниями молекулярной системы (DA), характеризуемой волновыми функциями типа (XIII.5.5), электронные переходы необходимо рассматривать с учетом ядерных степеней свободы.

На рис. XIII.7 изображены поверхности потенциальной энергии начального U_i и конечного $U_f(D^+A^-)$ состояний комплекса (DA), отличающихся друг от друга электронными квантовыми числами k и k' и набором колебательных чисел n и n' .

Рассмотрим вначале качественную картину перехода:

$$\Psi_{k,n}(r, R) \rightarrow \Psi_{k',n'}(r, R). \quad (\text{XIII.5.6})$$

Пусть поверхности U_i и U_f являются параболами, соответствующими гармоническим осцилляторам с одинаковыми частотами ω , т. е. будем считать, что при переходе $\Psi_i \rightarrow \Psi_f$ частота колебаний ядер не изменяется, а происходит только изменение их равновесной конфигурации $R_{0i} \rightarrow R_{0f}$. Величина смещения ΔR_0 характеризует связь электронных и ядерных степеней свободы. В случае сильной связи выполняется соотношение $\Delta = \Delta R_0/a_0 \gg 1$, где $a_0 = \sqrt{\hbar/(M\omega)}$ — амплитуда нулевых колебаний. Если система за счет движения ядер достигает точки R^*

пересечения термов U_i и U_f , где электронные энергии начального и конечного состояний равны

$$U_{k,n}(R^*) \approx U_{k',n'}(R^*), \quad (\text{XIII.5.7})$$

то становится возможным резонансный электронный переход вследствие взаимодействия, определяемого электронным матричным элементом V_{ij} (XIII.4.4). При этом переходе энергия системы не меняется, так как в точке R^* выполняется равенство (XIII.5.7), т. е. вблизи R^* без дополнительной

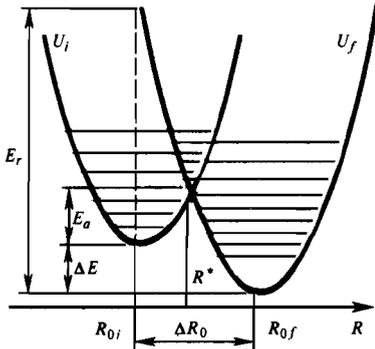


Рис. XIII.7.

Электронно-колебательные взаимодействия при туннелировании электрона (по Don Devault, 1980):

E_0 — энергия активации, E_r — энергия реорганизации, ΔE — тепловой эффект процесса туннелирования, ΔR_0 — смещение положения равновесия ядер при переходе из электронного состояния i в состояние f ; остальные объяснения см. в тексте

энергии может произойти перестройка электронной волновой функции, которая скачком изменяется с $\Phi_{(i)k}(r, R)$ на $\Phi_{(f)k}(r, R)$. Вероятность перехода в единицу времени электрона в конечном состоянии при $R \approx R^*$ пропорциональна величине V_{ij}/\hbar .

В силу большой разницы в массах электронов и ядер справедлив принцип Франка — Кондона (см. § 2 гл. X): за время электронного перехода не успевают заметно измениться координаты и векторы скорости ядер. Следовательно, вероятность перехода электронно-ядерной системы из начального (k, n) в конечное (k', n') электронные состояния должна зависеть от степени близости ядер к точке R^* , т. е. и от ядерных волновых функций $\chi_{kn}(R)$ и $\chi_{k'n'}(R)$. Если точка R^* находится в классически недоступной для ядер области, то она может быть достигнута только за счет туннелирования самих ядер. В свою очередь, туннелирование ядер, аналогичное электронному туннельному переносу, зависит от степени перекрытия ядерных волновых функций начального $\chi_{kn}(R)$ и конечного $\chi_{k'n'}(R)$ состояний, которая определяется интегралом перекрытия, или фактором Франка — Кондона:

$$F_{n,n'}^{k,k'} = \left| \int \chi_{kn} \chi_{k'n'} dR \right|^2, \quad (\text{XIII.5.8})$$

Как видно из рис. XIII.7, при переходе меняется номер колебательного подуровня:

$$n' = n + p, \quad (\text{XIII.5.9})$$

где $p = \Delta E / (\hbar\omega)$, а ΔE — разность энергетических уровней $\Delta E = E_i - E_f$.

Таким образом, вероятность перехода (XIII.4.1) оказывается пропорциональной величине

$$W_{i,n,i,n'} \sim \frac{V_{ij}}{\hbar} F_{nn'}^{ij} \rho_{f,n'}(E_{i,n}) \quad (\text{XIII.5.10})$$

В выражении (XIII.5.10) фактор Франка — Кондона F_{nn}^{ij} учитывает эффекты, связанные с перестройкой ядерной конфигурации. После попадания на подуровень $n' = n + p$ конечного терма происходит быстрая, за 10^{-12} с (см. §2

гл. X), диссипация избытка колебательной энергии с переходом на нижние колебательные подуровни конечного состояния. Это означает, что в (XIII.5.10) плотность конечных состояний $\rho_{fn'}(E)$ определяется лоренцевской функцией с шириной, зависящей от скорости колебательной релаксации уровня (f, n') при значении энергии E , равной энергии начального состояния E_{in} . Если избыток энергии ΔE , или тепловой эффект реакции, идет главным образом на возбуждение колебательных мод R , то последние называются акцептируемыми модами.

Из рис. XIII.7 видно также, что в случае $\Delta = \Delta R_0/a_0 \gg 1$ с увеличением номера n колебательного подуровня начального состояния ширина барьера для туннелирования ядер уменьшается. Одновременно уменьшается также высота барьера, равная разности энергий термов в точке R^* и соответствующего колебательного подуровня начального терма. Таким образом, с ростом номеров колебательных подуровней в состоянии i увеличивается вероятность перехода, но одновременно падает и их заселенность.

Скорость туннелирования. Константу скорости переноса находят путем сложения произведений парциальных значений скоростей переходов с каждого подуровня на вероятности их заселенностей при заданной температуре T . Средняя скорость перехода определяется как

$$W_{if} = (W_0 + W_1 e^{-\hbar\omega/(k_B T)} + W_2 e^{-2\hbar\omega/(k_B T)} + \dots) / (1 + e^{-\hbar\omega/(k_B T)} + e^{-2\hbar\omega/(k_B T)} + \dots), \quad (\text{XIII.5.11})$$

где в случае сильной связи ($\Delta \gg 1$) $W_1 \gg W_0$. Отсюда видна и качественная физическая причина двухфазной температурной зависимости туннелирования электрона в случае сильной электронно-колебательной связи (см. (XIII.5.6)). При больших температурах преобладают переходы с высоких колебательных подуровней (W_1), а при низких, наоборот, туннелирование электрона сопряжено с туннелированием ядер с основного колебательного подуровня. Приблизительно можно считать

$$W_{if} \approx W_0 + W_1 e^{-\hbar\omega/(k_B T)}, \quad (\text{XIII.5.12})$$

где $W_1 \gg W_0$.

В случае одномерных параболических термов и неизменной частоты колебаний явный вид зависимости фактора Франка — Кондона от n и $n+1$ дается точной формулой

$$F_{n,n'}^{k,k'} = n!(n+p)! S^p e^{-S} \left[\sum_{i=0}^n \frac{(-S)^i}{i!(n-i)!(p+i)!} \right]^2; \quad n' - n = p, \quad (\text{XIII.5.13})$$

где параметр

$$S = \Delta^2/2 = M(\Delta R)^2 \omega / (2\hbar) \quad (\text{XIII.5.14})$$

называется константой электронно-колебательной связи. Он отражает величину относительной деформации молекулы вдоль координаты R акцептирующей моды ω при изменении электронного состояния.

На рис. XIII.7 отрезок E_r называется энергией реорганизации системы. Она соответствует работе, которая потребовалась бы для сдвига координат ядер из начального равновесного состояния до равновесных значений координат конечного состояния при условии, что система остается на начальном терме. Как видно из рис. XIII.7,

$$E_r = k(\Delta R_0)^2/2, \quad (\text{XIII.5.15})$$

где k — константа упругости, $k = M\omega^2$.

Сравнение формул (XIII.5.15) и (XIII.5.14) показывает, что

$$E_r = \hbar\omega S, \quad (\text{XIII.5.16})$$

т. е. энергия реорганизации также характеризует перестройки, которые происходят в системе при переносе электрона.

Из рис. XIII.7 можно видеть, что энергия активации

$$E_a = \frac{kR^2}{2} = \frac{k(\Delta R_0 - R_{0i})^2}{2} + \Delta E, \quad (\text{XIII.5.17})$$

или с учетом (XIII.5.15), (XIII.5.16), (XIII.5.17)

$$E_a = \frac{(E_r - \Delta E)^2}{4E_r} = \frac{(S\hbar\omega - \Delta E)^2}{4S\hbar\omega}. \quad (\text{XIII.5.18})$$

Если частоты колебаний ядер при электронном переходе по-прежнему предполагаются неизменными, то в гармоническом приближении можно написать практически точную формулу для константы скорости перехода (см. (XIII.5.11)):

$$W_{if} = \frac{|V_{if}|^2}{\hbar^2} e^{-G} \int_{-\infty}^{\infty} dt \exp\left\{-i \frac{\Delta E}{\hbar} t + G_+(t) + G_-(t)\right\}. \quad (\text{XIII.5.19})$$

Здесь

$$G_+(t) = \sum_j \frac{\Delta_j^2}{2} (\bar{n}_j + 1) e^{i\omega_j t}. \quad (\text{XIII.5.20})$$

G_+ связано с возбуждением колебательных квантов с частотами ω_j ; j нумерует нормальные колебания системы;

$$G_-(t) = \sum_j \frac{\Delta_j^2}{2} \bar{n}_j e^{i\omega_j t}. \quad (\text{XIII.5.21})$$

G_- связано с поглощением колебательных квантов при электронном переходе; \bar{n}_j — средняя заселенность осциллятора с частотой ω_j при тепловом равновесии, равная $(\exp[\hbar\omega_j/(k_B T)] - 1)^{-1}$. Величина G равна

$$G = \sum_j \frac{\Delta_j^2}{2} (2\bar{n}_j + 1) = G_+(0) + G_-(0). \quad (\text{XIII.5.22})$$

Формула (XIII.5.19) дает сходящийся результат, если учесть, что возбужденные колебательные подуровни имеют конечную ширину или время затухания. Это равносильно наличию мнимых добавок (см. (XIII.3.13)) к энергиям ΔE или к $\hbar\omega_j$:

$$\omega = \omega_0 - i\Gamma/2. \quad (\text{XIII.5.23})$$

Учет этого обстоятельства приведет к лоренцевской форме ширины колебательного подуровня (см. (XIII.3.16)).

§ 6. Случай сильной и слабой электронно-колебательной связи

Формула (XIII.5.19) дает хорошее совпадение с экспериментальными данными по температурной зависимости константы скорости. Рассмотрим особо часто встречающиеся предельные случаи сильной ($S \gg 1$) и слабой ($S \ll 1$) связи (см. (XIII.5.14)).

Слабая электронно-колебательная связь. Этот случай реализуется при внутримолекулярных релаксационных процессах в больших ароматических молекулах. Как правило, эти процессы не сопровождаются разделением зарядов. При $S \ll 1$ вычисление интеграла (XIII.5.20) приводит к формуле

$$W_{if} = \sqrt{\frac{2\pi}{\gamma \Delta E_0 \hbar \omega}} \cdot \frac{V_{if}^2}{\hbar} e^{-\gamma \Delta E_0 / (\hbar \omega)} \quad (\text{XIII.6.1})$$

$$\text{где } \gamma = \ln \left[\frac{\Delta E_0}{S \hbar \omega (n+1)} \right] - 1.$$

Как видно из (XIII.6.1), вероятность безызлучательного перехода в случае слабой связи экспоненциально уменьшается при увеличении числа возбуждаемых квантов $\Delta E / (\hbar \omega)$. Следовательно, роль акцептирующих мод при этом выполняют наиболее высокочастотные колебания. Как правило, это колебания атомов водорода в химических группах ароматических соединений C—H, O—H, N—H ($\hbar \omega_{\text{C—H}} = 3000 \text{ см}^{-1} \sim 0,4 \text{ эВ}$).

Величина относительных смещений $\Delta_{\text{C—H}}$ для валентных колебаний ароматических углеводов составляет $\sim 0,1$, а для деформационных $\Delta \sim 0$. Случай слабой связи представлен графически на рис. XIII.8 (I). Слабая связь соответствует небольшим перестройкам в среде при электронном переходе. Анализ выражения (XIII.6.1) показывает, что в этом случае W_{if} слабо зависит от температуры; это вполне понятно, так как в случае слабой связи $W_1 < W_0$.

Сильная электронно-колебательная связь ($S \gg 1$). Этот случай фактически приведен на рис. XIII.7. Можно показать, что в случае одной акцептирующей моды ($S \gg 1$)

$$W_{if} = \frac{2\pi V_{if}^2}{\hbar^2 \omega} \left(\frac{\bar{n}+1}{\bar{n}} \right)^{\frac{q_0}{2}} I_{q_0} \{ 2S [(\bar{n}+1)\bar{n}]^{1/2} \} e^{-(2\bar{n}+1)S}, \quad (\text{XIII.6.2})$$

где q_0 — целое число, ближайшее к $\Delta E_0 / (\hbar \omega)$; $I_{q_0}(z)$ — модифицированная функция Бесселя:

$$I_n(z) = \frac{1}{\pi} \int_0^\pi e^{z \cos \theta} \cos(n\theta) d\theta. \quad (\text{XIII.6.3})$$

Температурная зависимость константы W_{if} определяется изменением средней заселенности колебательных уровней

$$\bar{n} = [e^{\hbar \omega / (k_B T)} - 1]^{-1} = \begin{cases} 0 & \text{при } k_B T \ll \hbar \omega, \\ k_B T / \hbar \omega & \text{при } k_B T \gg \hbar \omega. \end{cases} \quad (\text{XIII.6.4})$$

При низких температурах, когда $k_B T \ll \hbar \omega$, $\bar{n} \rightarrow 0$, имеется безактивационная, или туннельная по ядрам, область

$$W_{if} = \frac{2\pi}{\hbar \omega} |V_{if}|^2 e^{-S} S^{q_0} \frac{1}{q_0!}. \quad (\text{XIII.6.5})$$

Наоборот, в области высоких температур, где $k_B T \gg \hbar \omega$, наблюдается обычная по форме аррениусовская зависимость, хотя электронный переход носит по-прежнему туннельный характер:

$$W_{if} = \frac{2\pi V_{if}}{\hbar} \sqrt{\frac{\pi}{S k_B T \hbar \omega}} e^{-E_a / (k_B T)}, \quad (\text{XIII.6.6})$$

где E_a — энергия активации, определяемая по (XIII.5.18).

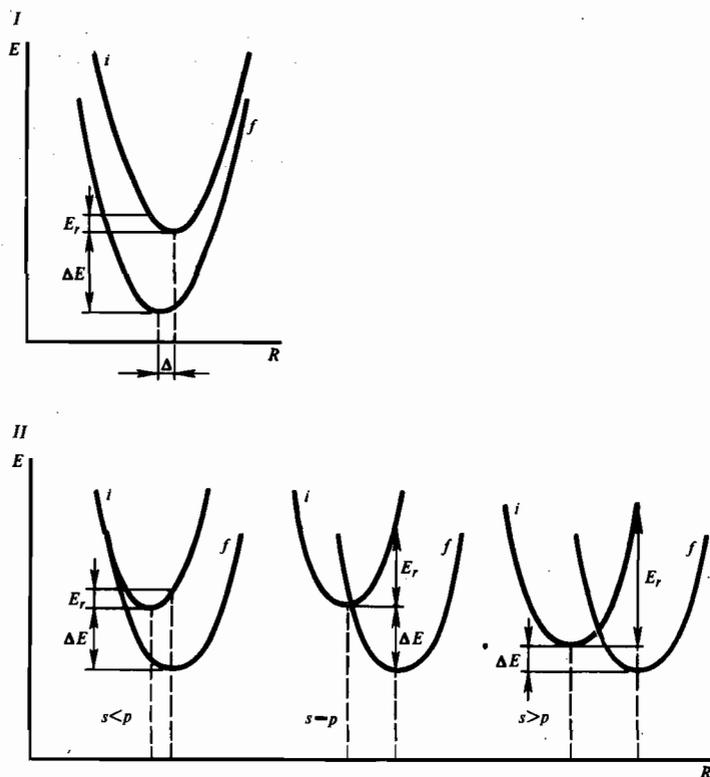


Рис. XIII.8.

Потенциальные поверхности начального и конечного состояний в случае слабой (I) и сильной (II) электроинно-колебательной связи (объяснение см. в тексте).

Значение параметров системы, например для реакции окисления цитохрома *c* в фотосинтезирующих бактериях, можно получить из экспериментальной зависимости скорости реакции от температуры (см. рис. XIII.1).

Принимая $\Delta E_0 = 0,45$ эВ, что соответствует разности окислительно-восстановительных потенциалов между цитохромом и пигментом, можно, зная E_a из опытных данных, найти из (XIII.5.18) E_r , а затем из (XIII.5.15) и (XIII.5.17) значения параметра S или Δ^2 . При величине колебательного кванта $\hbar \omega \sim 0,05$ эВ оказывается, что $1/2 \Delta^2 = 20$; $V_{if} = 3 \cdot 10^{-5}$ эВ; $L = 1,2$ нм. Дополнительным свидетельством тесной связи процесса переноса электрона с электроинно-колебательными взаимодействиями является изотопный эффект уменьшения скорости окисления цитохрома $W_{if}(T)$ в 1,2—1,4 раза при всех температурах после замены в образце H_2O на D_2O . Энергия активации процесса при этом

практически не меняется. Наличие изотопного эффекта в низкотемпературной области означает, что перенос электрона лимитируется не конформационными перестройками относительно больших фрагментов белка, а участием атомов водорода в акте электронной перестройки донора и акцептора электронов. Фактически речь идет об элементарном акте взаимодействия донорной и акцепторной групп, где роль акцептирующей моды состоит в обеспечении необратимого характера переноса электрона между ними.

В рамках одномодового приближения легко видеть, что качественно температурная зависимость скорости переноса определяется соотношением между двумя параметрами: S (XIII.5.14), (XIII.5.16) и p (XIII.5.9). Параметр $S = 1/2\Delta^2 = E_r/\hbar$ задает энергию реорганизации ядерной подсистемы при электронном переходе, а параметр p — тепловой эффект реакции. На рис. XIII.8 (II) изображены системы электронных термов для трех случаев: $S < p$, $S = p$ и $S > p$. Как видно, процесс переноса электрона имеет безактивационный характер и не зависит от температуры при $S = p$. Условия $S < p$ и $S > p$ обеспечивают активационный характер переноса, что особенно проявляется при больших S (см. рис. XIII.7) в случае сильной связи.

Роль мягких мод. В реальных процессах переноса электрона в белках существенную роль должны играть не только квантовые акцептирующие моды, но целый набор низкочастотных внутримолекулярных мягких мод, присущих белковой молекуле (см. § 2 гл. X). Очевидно, сопряжение мягких мод, определяющих перестройки в белке с процессами транспорта электрона, могут повлиять на образование акцептирующей моды и параметры S , p самого контактного донорно-акцепторного комплекса (DA), где происходит собственно акт переноса электрона. Именно этим обстоятельством, отражающим активную роль белкового окружения, можно, в частности, объяснить большое различие в наблюдаемых температурных зависимостях переноса электрона в реакционных центрах фотосинтеза на разных объектах (см. гл. XXVII). Роль мягких мод может проявляться и в предотвращении обратных реакций после переноса электрона. Это обеспечивается такой конформационной перестройкой в контактном комплексе, в результате которой после переноса электрона донорные и акцепторные протестические группы расходятся и перестают взаимодействовать друг с другом.

Как будет показано ниже, в ряде случаев обратные реакции переноса не только идут намного медленнее, чем прямые, но и замедляются при повышении температуры, что формально соответствует отрицательным энергиям активации. С другой стороны, изменение электронного состояния активного центра акцептора влечет за собой вследствие электронно-конформационных взаимодействий каскад последовательных внутримолекулярных конформационных перестроек в белке (см. § 1 гл. X). Эти направленные перестройки, естественно, выходят за рамки чисто диссипативных процессов в контактном комплексе, вовлекая уже мягкие моды. Роль белковых мод в переносе электрона выявляется в наибольшей степени в прямых экспериментах при изучении температурных зависимостей (см. гл. XXVIII). Соответствующие теоретические модели, учитывающие эти эффекты, в настоящее время интенсивно разрабатываются.

§ 7. Перенос электрона по белковой цепи

Проводимость белков. Туннельный механизм обеспечивает элементарный акт переноса электрона между донорно-акцепторными группами в белке, находящимися друг от друга на расстоянии порядка 0,5—1,0 нм. Однако существует много примеров, когда электрон переносится в белке на гораздо большие рас-

стояния. Существенно, что при этом перенос происходит не только в пределах одной молекулы белка, но и может включить взаимодействие разных белковых молекул. Так, в реакции переноса электрона между цитохромами *c* и цитохром-оксидазой и цитохромом *b₅* оказалось, что расстояние между гемами взаимодействующих белков составляет более 2,5 нм.

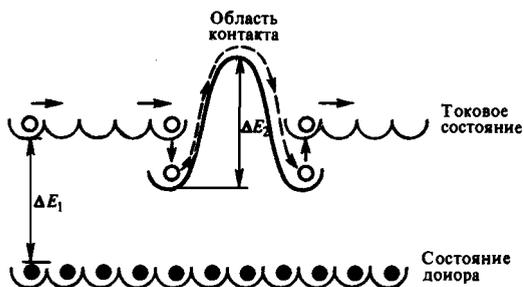


Рис. XIII.9.

Схема примесной проводимости белков за счет движения активированного электрона по токовым состояниям белковой макромолекулы и активированного перескока электрона в контактной области между макромолекулами (по Э. Г. Петрову, 1984)

Другая особенность переноса электрона заключается в важной роли отдельных групп белка, образующих друг с другом «активные» контактные комплексы. Например, окисление миоглобина (*Mb*) цитохромом *c* (цит. *c*) проходит при контактах на ограниченных участках поверхностей этих нейтральных молекул главным образом в области расположения *гис* A10 и *гис* GH1 у молекулы *Mb* и остатков *лиз*-13, *лиз*-87 и поверхностной карбоксильной группы гема у молекулы цит. *c*. Расстояние между гемами *Mb* и цит. *c* составляет не менее 3,0 нм. Каталитическое окисление *Mb* ионами *Cu* также сопряжено с участием *гис* GH1 и *гис* A10 и делокализацией электрона по их пептидным группам. Модификация состояний *гис* A10 и *гис* GH1 при изменении pH среды влияет на перенос электрона. Это также подтверждает наличие в белковой глобуле пути переноса (или «электронной тропы»), вдоль которого и происходят акты туннелирования от донорной группы к акцепторной. Иными словами, перенос электрона между белковыми макромолекулами связан с конкретными путями движения электрона внутри отдельных молекул, а также с образованием контактных комплексов на их поверхностях.

Рассмотрим кратко экспериментальные доказательства подвижности электронов в белке. Пусть заряженная частица массы m и заряда q движется под действием переменного электрического поля напряженности $E(t) = E_0 \exp(i\omega t)$, где ω — частота изменения амплитуды поля. В отсутствие трения уравнение движения для частицы имеет вид $mv = qE$, где $v = \dot{x}$ — скорость частицы в направлении приложенного поля. Если на частицу действует сила трения $-\gamma v$, пропорциональная ее скорости, то (см. (XI.1.8))

$$\dot{v} + v/\tau = E/m, \quad (\text{XIII.7.1})$$

где $\tau = (\gamma/m)^{-1}$ — время релаксации скорости частицы, т. е. время торможения в среде за счет сил трения (γv) в отсутствие внешней силы (qE). Подвижность характеризует способность среды переносить отдельный заряд и выражается как

$$u = v/E, \quad (\text{XIII.7.2})$$

т. е. u — коэффициент пропорциональности между скоростью движения и направленностью электрического поля: $v = uE$.

По определению, ток I есть число зарядов, переносимых в единицу времени через единичную площадку:

$$I = qNv, \tag{XIII.7.3}$$

где N — плотность зарядов в проводящем состоянии. Сравнивая (XIII.7.3) и (XIII.7.2), можно найти связь между числом переносимых зарядов, или проводимостью σ ,

$$\sigma = I/E \tag{XIII.7.4}$$

и подвижностью u :

$$\sigma = qNv/E = qNu. \tag{XIII.7.5}$$

Измерения проводимости белков показали, что значения σ составляют $10^{-10} - 10^{-20} \text{ Ом}^{-1}/\text{м}$ и возрастают с увеличением влажности и температуры. Энергия активации электронной проводимости составляет около 1 эВ, что намного меньше ширины запрещенной зоны ΔE (см. рис. XII.13). Это явно указывает на примесный характер проводимости белков. На рис. XIII.9 приведена энергетическая схема примесной проводимости. Энергия электрона на донорной группе меньше энергии его в токовом состоянии на величину ΔE_1 , причем ΔE_1 намного меньше ΔE . Поэтому активация электрона при конечных температурах приводит к его попаданию в токовое состояние, где он движется под действием электрического поля. Достигая контактной области между макромолекулами, электрон может ее преодолеть при достаточной энергии активации ΔE_2 . Таким образом, по белку движется электрон, поступающий в полипептидную цепь извне. В переменном электрическом поле высокой частоты электрон, попавший в токовое состояние, не успевает достичь границы макромолекулы, так как его направление движения изменяется под действием электрического поля. Поэтому вклад межмолекулярных перескоков становится пренебрежимо малым, а проводимость возрастает. В этих условиях можно измерять уже энергию активации непосредственно примесной проводимости

$$\sigma(T) = \sigma_0 \exp [\Delta E_1 / (k_B T)]. \tag{XIII.7.6}$$

Так, по данным Э. М. Трухана, значения подвижности u [$\text{м}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$] в переменном электрическом поле составили для цитохрома $c \sim 1 \cdot 10^{-4}$, для гемоглобина $\sim 2 \cdot 10^{-4}$. В целом оказалось, что для большинства белков проводимость осуществляется в результате прыжков электронов между локализованными донорными и акцепторными состояниями, разделенными расстояниями в десятки нанометров. Лимитирующей стадией в процессе переноса является не движение заряда по токовым состояниям, а релаксационные процессы в доноре и акцепторе.

Модели проводимости белков. Рассмотренная в § 2 гл. XII энергетическая структура белка (см. рис. XII.13) показывает, что избыточный для белка электрон не может удержаться в зоне проводимости. Однако это противоречит приведенным выше экспериментальным данным по проводимости белков и означает, очевидно, что в энергетической модели учтены не все одноэлектрон-



Рис. XIII.10. Энергетическая схема полипептидной цепи (объяснение см. в тексте) (по Е. G. Petrov, 1978)

ные состояния белка. На рис. XIII.10 показана схема энергетических зон полипептидной цепи, рассчитанная с учетом $3s$ -, $3p$ -состояний. Как видно, здесь обеспечивается участие $3s$ -, $3p$ -связывающих орбиталей в формировании зоны проводимости белка. Это имеет существенное значение, поскольку конформационные изгибы полипептидной цепи не влияют на характер ковалентных связей первичной структуры, а следовательно, и на перенос электрона

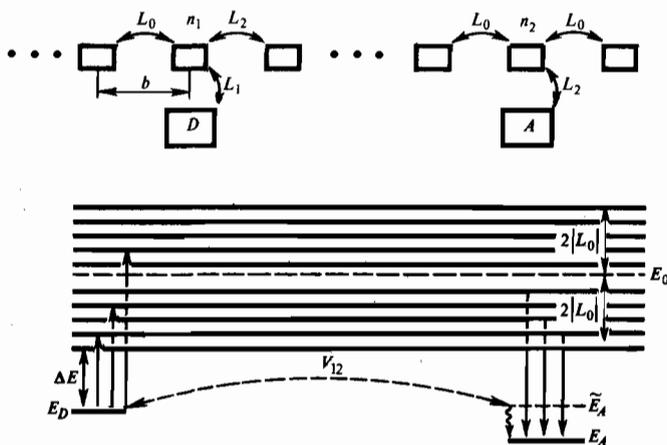


Рис. XIII.11.

Два донорно-акцепторных механизма переноса электрона по зоне проводимости в белке (по Е. Г. Petrov, 1978)

При тепловой активации электрона с основного уровня донора E_D переходит в зону проводимости, а затем релаксирует из зоны на основной уровень акцептора E_A . При больших значениях ΔE (от E_D до нижнего края зоны проводимости) или низких температурах перенос электрона обеспечивается механизмом, аналогичным туннельному переносу электрона через среду-медиатора, когда квантовые свойства электрона играют первостепенную роль. В этом случае перенос зависит от перекрытия молекулярной орбиталей (МО) донора с МО n_1 -го звена цепи (L_1), МО акцептора с МО n_2 -го звена цепи (L_2) и МО ближайших звеньев цепи (L_0) (остальные пояснения см. в тексте)

по зоне проводимости, образованной $3s$ -, $3p$ -связывающими орбиталями. В этом состоит отличие $3s$ -, $3p$ - и $\hat{\pi}^*(3p)$ -зон проводимости, поскольку регулярная структура последней определяется характером трансляционной симметрии твердого тела.

В соответствии с моделью Петрова существует два механизма переноса электрона, сходных с механизмом рекомбинационного взаимодействия примесей при медиаторной роли полипептидной цепи (рис. XIII.11).

При рассмотрении активационного перехода роль такого рода взаимодействия был учтена только для звеньев цепи-медиатора, что определяет ширину зоны токовых состояний $4|L_0|$. Именно последовательное перекрытие МО донора с МО звеньями цепи, а через них — с МО акцептора приводит к эффективному взаимодействию, которое обеспечивает прямой квантовый перескок электрона между донором и акцептором.

Выражение, определяющее величину резонансного взаимодействия V , имеет вид

$$V_{1,2} = \frac{L_1 L_2}{\sqrt{(E_0 - E)^2 - 4L_0^2}} e^{-\xi n}; \quad \xi = -\ln \frac{(E_0 - E) - \sqrt{(E_0 - E)^2 - 4L_0^2}}{2|L_0|}, \quad (\text{XIII.7.7})$$

где $n = |n_1 - n_2|$ — число звеньев цепи между донором и акцептором; E_0 — положение центра зоны проводимости. При условии $\Delta E \ll 4|L_0|$ ($\Delta E = E_0 - -2|L_0| - E$) выражение (XIII.7.7) преобразуется:

$$V_{1,2} = L_1 L_2 a \frac{\sqrt{m^*}}{\hbar \sqrt{2\Delta E}} e^{-R\sqrt{2m^*\Delta E}/\hbar} [m^* = \hbar/(2a^2|L_0|)], \quad (\text{XIII.7.8})$$

где $R = nb$ — путь в единицах расстояния b между ближайшими звеньями цепи вдоль заданного направления движения электрона; m^* — эффективная масса избыточного электрона в цепи-медиаторе.

Выражение (XIII.7.8) для донорно-акцепторного переноса внешне сходно с формулой (XIII.3.9) для туннельного транспорта. Однако различие состоит в физическом смысле величин, входящих в экспоненты выражений (XIII.3.9) и (XIII.7.8). В частности, R в (XIII.7.8) означает путь туннелирования, который не обязательно совпадает с кратчайшим расстоянием между D и A , как в случае (XIII.3.9). Путь электрона может проходить вдоль электронной тропы через остов белковой цепи между звеньями n_1 и n_2 .

§ 8. Динамика электронно-конформационных взаимодействий

Как неоднократно подчеркивалось, основу для понимания физических механизмов функционирования биологических макромолекул составляет концепция электронно-конформационных взаимодействий. Это ярко проявляется в процессах переноса электрона, сопровождающихся направленными конформационными изменениями белковой глобулы (см. § 1 гл. X). Электронно-конформационные взаимодействия в данном случае включают два рода явлений: собственно перенос электрона и внутримолекулярное движение в белке по конформационным состояниям. Взаимосвязь этих двух явлений и составляет сущность электронно-конформационных взаимодействий.

В § 5 и 6 этой главы показано, что элементарный акт межмолекулярного переноса электрона представляет собой процесс неупругого туннелирования электрона. Изменения зарядового состояния молекулярной группы приводят к деформации поверхности потенциальной энергии ядер (электронный терм; см. рис. XIII.8). Вероятность переноса электрона задается в общем случае формулой (XIII.5.10) и зависит от характера электронно-колебательной связи. Обычно мода с наибольшим значением параметра связи S (XIII.5.14) принимает на себя избыток энергии (тепловой эффект реакции) и называется акцептирующей модой. Движение ядер, связанное с диссипацией энергии по акцептирующей моде, носит внутримолекулярный колебательный характер и при амплитудах колебаний $\lesssim 0,01$ нм может быть описано с помощью уравнений динамического типа.

В § 1 гл. XI было показано, что для описания микроконформационных движений белка с амплитудами $\gtrsim 0,1$ нм следует учитывать стохастический характер этих движений, при котором происходят столкновения движущейся молекулярной группы белка с окружающими молекулярными группами. Это значит, что смещение фрагмента на расстояние $\sim 0,1$ нм и больше в конденсированной среде может происходить только при определенных флуктуациях плотности и образовании микрополости («дырка») рядом с движущейся молекулярной группой. Иными словами, конформационное смещение фрагмента цепи требует преодоления потенциальных барьеров. Это эквивалентно движению в вязкой среде или миграции системы по множеству конформационных подсостояний в области, ограниченной некоторым конформационным потенциалом (см. рис. XI.2).

Таким образом, в рассматриваемом случае электронно-конформационные взаимодействия индуцируют изменения по двум степеням свободы. Во-первых, непосредственный акт приема и задержки электрона в акцепторе сопряжен с диссипирующей частью электронной энергии ($\leq 0,1$ эВ) по внутримолекулярной акцептирующей моде, что сопровождается движениями ядер с малыми амплитудами $\leq 0,01$ нм за время $10^{-12} - 10^{-13}$ с. Во-вторых, в результате такого

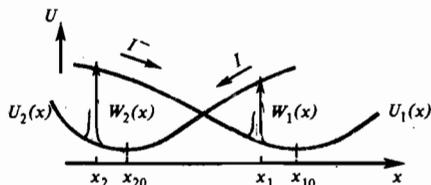


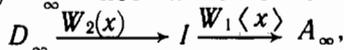
Рис. XIII.12. Модель молекулярного «насоса», или электронно-конформационное взаимодействие в процессе электронного транспорта. Стрелками указано направление конформационной релаксации

Скорость каждой стадии зависит от конформации групп I и I^- . При изменении этой конформации, или конформационной координаты x , достаточно резко меняется и константа скорости $W(x)$. Движение каждой из групп I и I^- происходит вдоль координаты x в области, ограниченной собственным конформационным потенциалом $U_2(x)$ и $U_1(x)$

изменения зарядового состояния макромолекула оказывается в конформационно-напряженном состоянии и, следовательно, затем переходит в новое конформационно-равновесное состояние уже не конформационной координате с амплитудами движения $\geq 0,1$ нм за время, много большее $10^{-12} - 10^{-13}$ с.

Связь конформационной подвижности с переносом электрона (модель). Каким образом стохастический характер конформационной подвижности связан с функциональной активностью белка? Речь идет об известной (см. § 1 гл. X) зависимости скорости переноса электрона от конформации определенных фрагментов цепи, т. е. от конформационной координаты. Эта зависимость может быть обусловлена (как было показано в § 7 этой главы) необходимостью выполнения определенных стерических условий для туннелирования электрона и выражается в виде резкой зависимости константы скорости переноса от конформационной координаты. В сущности, причина этого состоит в формировании и разрушении контактных активных состояний между донорно-акцепторными группами и соответственно в образовании и разрушении акцептирующей моды при спонтанных перемещениях реагирующих групп.

Рассмотрим простейшую модель (К. В. Шайтан, А. Б. Рубин) — перенос электрона от постоянного источника D_∞ на белковую группу I , которая затем отдает электрон акцептору A_∞ с постоянной емкостью.



где $W_2(x), W_1(x)$ — константы скоростей переноса, зависящие от конформационной координаты x . Это движение (рис. XIII.12), имеющее характер ограниченной диффузии, было рассмотрено в § 1 гл. XI и может быть описано уравнением Ланжевена (XI.1.8):

$$m\ddot{x} + \gamma(x)\dot{x} + \partial U(x)/\partial x = F(t)$$

либо при пренебрежении инерциальным членом эквивалентным ему уравнением Фоккера — Планка:

$$\frac{\partial p(x, t)}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} D(x) \left\{ \frac{\partial p(x, t)}{\partial x} + \frac{1}{k_B T} p(x, t) \frac{\partial U(x)}{\partial x} \right\}. \tag{XIII.8.1}$$

где $U(x)$ — конформационный потенциал; $D(x)$ — коэффициент конформационной диффузии:

$$D(x) = k_B T / \gamma(x) = D_0 e^{-\epsilon(x)/(k_B T)}, \quad (\text{XIII.8.2})$$

где $\epsilon(x)$ — энергия активации конформационной подвижности (XI.1.28); $\gamma(x)$ — коэффициент трения (XI.1.5) — (XI.1.6); $p(x, t)$ — плотность вероятности для конформации x в момент t . Зависимость $D(x)$ определяется в основном зависимостью энергии активации $\epsilon(x)$ конформационной подвижности от координаты x . В обсуждаемой модели (рис. XIII.12) связь скорости электронного транспорта с конформационной подвижностью групп I и I^- также описывается уравнениями типа (XIII.8.1) с добавочными членами $W_2(x)p_2(x, t)$ и $W_1(x)p_1(x, t)$, которые отражают реакции переноса электрона группой I .

Механизм сопряжения. Функциональная активность группы I в переносе электрона связана с ее подвижностью следующим качественным образом (см. рис. XIII.12). При движении вдоль координаты x в потенциальном поле $U_2(x)$ группа I попадает в точку x_2 . В этой точке происходит химическая реакция восстановления I от D_∞ с константой скорости $W_2(x)$. Величина $W_2(x)$ определяется по формуле (XIII.5.10) неупругого туннелирования, а стохастическое движение по координате x описывается уравнением Фоккера — Планка (см. (XIII.8.1)). Времена корреляции (τ_c) для конформационных движений много больше времен внутримолекулярной релаксации по акцептирующей моде, определяемых шириной (Γ) колебательных подуровней ($\tau_c \gg 1/\Gamma$). Иными словами, процесс безызлучательного переноса электрона в белках характеризуется двумя уровнями организации. Это, во-первых, электронно-колебательные взаимодействия и изменения непосредственно внутри донорно-акцепторного контактного комплекса, а во-вторых электронно-конформационные взаимодействия, охватывающие уже окружение реагирующих групп и зависящие от структуры и динамики белка. Акт восстановления группы I и образования группы I^- происходит за время $1/W_2(x)$, много меньшее, чем время корреляции конформационных движений. Он приводит к переходу системы с кривой $U_2(x)$ для I конформационной потенциальной энергии на кривую $U_1(x)$ для I^- , что изображено на рис. XIII.12 вертикальной стрелкой. Аналогично происходит обратный переход $U_1(x) \rightarrow U_2(x)$ при окислении I^- акцептором A_∞ с константой $W_1(x)$ в точке, где конформационная координата x становится равной x_1 . В результате этих переходов эффективный тепловой эффект каждой из стадий $Q_1(x)$ и $Q_2(x)$ зависит не только от внутримолекулярных диссипативных потерь электронной энергии в теплоту, но и от изменения конформационной энергии:

$$Q_1(x) = \Delta E_1 - \Delta U_{12}(x); \quad Q_2(x) = \Delta E_2 - \Delta U_{21}(x),$$

где ΔE_1 и ΔE_2 — тепловые эффекты внутримолекулярных реакций окисления-восстановления без учета конформационных взаимодействий $\Delta U_{12}(x) = \Delta U_{21}(x) = U_2(x) - U_1(x)$. Если $\Delta U(x) < 0$, как при переходах на рис. XIII.12, то соответствующая часть тепловой энергии не переходит сразу в теплоту в ходе быстрой колебательной релаксации ($\tau \sim 1/\Gamma$), а переходит в энергию напряжения конформации. Система уравнений (XIII.8.1) допускает нетривиальное стационарное решение, которое описывает функционирование молекулярной «машины». В том случае, когда конформационный потенциал групп I и I^- одинаков и имеет вид плоской «ямы», скорость переноса электрона в стационарном режиме имеет вид

$$W = W_\infty \frac{1 + 2\tau_c W_0}{1 + 2\tau_c W_\infty}, \quad (\text{XIII.8.3})$$

где $\bar{W}_\infty = \frac{1}{2} \frac{W_1 W_2}{W_1 + W_2}$ характеризует скорость процесса в отсутствие конформационных ограничений; $W_0 = \frac{1}{2} [W_1(x_2) + W_2(x_1)]$ — скорость переноса за счет перекрытия функций W_1 и W_2 в отсутствие всяких конформационных движений; $\tau_c = L^2/(2D)$ — среднее время диффузии от x_1 до x_2 ; L — длина потенциальной «ямы».

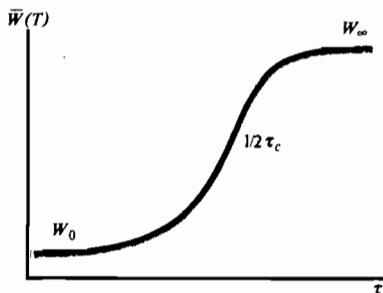


Рис. XIII.13.

Характерный вид температурной зависимости скорости процесса в случае сопряжения химической реакции с конформационной подвижностью.

Двухфазная температурная зависимость скорости электронного транспорта отражает не только сильные электронно-колебательные взаимодействия, но и характер конформационных движений групп, необходимых для формирования контактных состояний между ними; подробнее см. гл. XXVII

(остальные пояснения см. в тексте)

Механизм процесса состоит в том, что в точке x_1 молекула I превращается в ион I^- , который диффундирует до точки x_2 , где I^- отдает электрон. Далее молекула I диффундирует обратно. Таким образом, система работает как своеобразный молекулярный «насос» по «перекачке» электронов за счет диффузионной подвижности по конформационным подсостояниям, а в целом за счет общего теплового эффекта реакции $D_\infty \rightarrow A_\infty$. В отличие от макроскопических машин эта молекулярная машина обладает выделенной стохастической степенью свободы, поскольку тепловые флуктуации оказывают сильнейшее влияние на движение фрагментов белка с массой $< 10^{-14}$ г при амплитудах $\geq 0,1$ нм. Детерминистский «машинный» характер работы системы определяется не самим характером движения групп I и I^- , а формой потенциальной кривой $U(x)$ и наличием двух реакционноспособных конфигураций. Время диффузии или время корреляции конформационных движений экспоненциально зависит от температуры. Поэтому температурная зависимость скорости \bar{W} даже при постоянных значениях W_0 и W_∞ будет иметь характерный двухфазный вид, внешне аналогичный температурной кривой рис. XIII.1. В области температур, когда $1/W_\infty \ll \tau_c \ll 1/W_0$, скорость реакции практически определяется временем корреляции τ_c , а $\bar{W} \sim 1/2\tau_c$. Здесь будет наблюдаться активационный ход $\bar{W}(T)$, определяемый зависимостью $\tau_c^{-1} \sim e^{-\varepsilon/(kBT)}$. Температурно независимая часть определяется величиной W_0 (рис. XIII.13).

Конформационная подвижность и трансформация энергии. Конформационное состояние групп I и I^- определяется формой конформационного потенциала $U(x)$, которая в случае рис. XIII.12 не имеет резких локальных минимумов. Это означает, что образующееся в системе конформационное напряжение ΔU_{12} при переходах $U_1(x) \rightleftharpoons U_2(x)$ не запасается на долгое время, а диссипирует за время τ_c корреляции конформационного движения. Наряду с общим стохастическим характером внутримолекулярных движений при относительно гладких конформационных потенциалах в биомолекулах могут существовать и вполне определенные конформационные состояния, в которых молекулярные группы задерживаются на долгое время за счет взаимодействия с окружением. Это можно наглядно представить как наличие «внутримолекулярных фиксаторов», или «зашелок», взаимодействующих с диффундирующей группой и за-

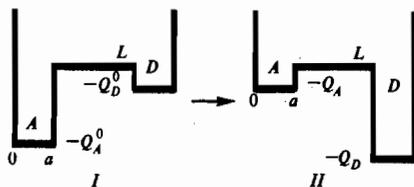
крепляющих ее местоположение при определенном значении конформационной координаты. На форме конформационной потенциальной кривой это отразится в виде разных локальных минимумов. Положение этих минимумов отражает зависимость взаимодействия молекулярной группы I с окружением от конформационной координаты.

Допустим, что система обладает двумя конформационными состояниями,

Рис. XIII.14.

Модель двух состояний для описания конформационного перехода в ходе химической реакции

Исходно (I) система находится в основном конформационном состоянии A с энергией $-Q$ и с меньшей вероятностью в состоянии D энергия $-Q_D^0$ ($|Q_A^0| > |Q_D^0|$). Заселенность конформационных состояний A и D определяется разностью Q_A, Q_D , а переходы между ними по конформационной координате вдоль барьера L носят диффузионный характер. Амплитуда движений молекулярной группы в пределах конформационного минимума составляет, как правило, $a \sim 0,01$ нм, а длина барьера L , разделяющего конформационные состояния A и D , не превосходит линейных размеров белка $L \sim 1,0$ нм, т. е. $a \ll L$. Электронно-конформационные взаимодействия приводят к тому, что при соединении электрона резко изменяет энергию устойчивых конформаций, а профиль конформационного потенциала системы приобретает форму II . Именно на этом этапе и происходит запасание энергии электрона в виде энергии конформационного напряжения состояния A с величиной, равной $|Q_A - Q_A^0|$



наиболее выгодными в энергетическом отношении (см. § 5 гл. IX). Моделируя эти состояния плоскими потенциальными «ямами», представим переходы между ними через энергетический барьер шириной L по конформационной координате x (рис. XIII.14). Когда $Q_A < Q_D$, система в основном должна перейти в равновесную конформацию D , в которой она отдает электрон внешнему акцептору. Динамика конформационного перехода после принятия электрона из конформации A в D описывается уравнением Фоккера — Планка, анализ которого для данного случая (К. В. Шайтан) дает значение характерного времени этого перехода

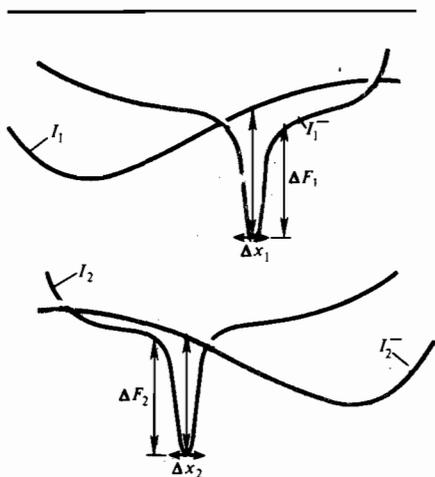
$$\tau_0 = \frac{aL}{D} e^{Q_A/(k_B T)} = \frac{aL}{D_0} e^{(Q_A + \epsilon)/(k_B T)}, \quad (\text{XIII.8.4})$$

где D и ϵ определены в (XIII.8.2). По порядку величины τ_0 имеет значение $\tau_0 \sim 4 \cdot 10^{-3}$ с при $a \sim 0,01$ нм, $L \sim 10$ нм, $\epsilon \sim 21$ кДж/моль, $Q_A \sim 21$ кДж/моль, $D_0 \sim 4 \cdot 10^{-6}$ см²/с. Таким образом, в биомакромолекулах электронные переходы сопряжены с внутримолекулярными конформационными переходами, которые сами по себе носят диффузионный характер. Однако в отличие от реакций в растворах диффузия активных групп ограничена в пространстве, причем имеются локальные минимумы конформационного потенциала, которые зависят от взаимодействия этих групп с окружением.

Проиллюстрируем роль «фиксаторов» на примере последовательных реакций переноса электрона $D \rightarrow I_1 \rightarrow I_2 \rightarrow A$. Предположим, что реакция $I_1^- \xrightarrow{\epsilon} I_2$ осуществляется только в очень узкой области значений (Δx_1 и Δx_2) конформационных координат групп I_1^- и I_2 (рис. XIII.15). В этом случае при наличии «фиксаторов» или «зашелок» в соответствующих конформациях электронный транспорт будет происходить значительно более эффективно, так как скорость

химической реакции будет пропорциональна вероятности заставить эти группы в областях Δx_1 и Δx_2 одновременно. Если фиксаторы отсутствуют, то эта вероятность пропорциональна $p \sim \Delta x_1 \Delta x_2 / (L_1 L_2) \ll 1$, где L_1 и L_2 — полные амплитуды движения групп I_1^- и I_2 . При наличии фиксаторов вероятность

$$p \sim \frac{1}{(e^{\Delta F_1 / (k_B T)} + 1)(e^{\Delta F_2 / (k_B T)} + 1)} \sim 1, \tag{XIII.8.5}$$



где ΔF_1 и ΔF_2 — изменение свободной энергии при локализации групп I_1^- и I_2 в минимумах потенциальной энергии ($\Delta F < 0$):

Величины $\Delta F_{1,2}$ определяются обычным образом:

$$\Delta F_{1,2} = \Delta E_{1,2} - T \Delta S_{1,2}, \tag{XIII.8.6}$$

где $\Delta E_{1,2} < 0$ — глубина защелки (ловушка); $\Delta S_{1,2} \sim k_B \ln(L_{1,2} / \Delta x_{1,2}) > 0$ — изменение энтропии группы при ее локализации. При реальных значениях параметров функция $p_0 = (1 + e^{\Delta F / (k_B T)})^{-1}$ относительно плавно зависит от температуры (рис. XIII.16).

Однако в эксперименте (см. гл. XXVIII) часто наблюдают очень резкие температурные зависимости эффективности электронного транспорта, напоминающие фазовый переход. Для интерпретации этих данных оказывается полезным привлечь понятие об электронной «тропее», разобранные выше (см. § 7 гл. XII). В самом деле, в случае электронной «тропы» реакция переноса

Рис. XIII.15. Организация цепи электронного транспорта $D \rightarrow I_1 \rightarrow I_2 \rightarrow A$ при наличии «зашелок» в активном состоянии (x_1, x_2) для реакции $I_1 \xrightarrow{e} I_2$

электрона идет через большое число промежуточных групп, которые находятся в конформационных состояниях, обеспечивающих эффективное перекрытие электронных орбит: $D \text{ --- } I_1 \text{ --- } \dots \text{ --- } I_N \text{ --- } A$.

Предположим, что эффективное перекрытие электронных волновых функций соседних групп реализуется в состояниях типа «фиксатор». В этом случае вероятность переноса электрона пропорциональна

$$p \sim \left(\frac{1}{1 + e^{\Delta F / (k_B T)}} \right)^N, \tag{XIII.8.7}$$

где в целях простоты предположили, что для всех $n = 1, \dots, N$ $\Delta F_n = \Delta F$. При $N \gg 1$ легко видеть, что скорость реакции резко замедляется в области $k_B T \sim \Delta F$ (рис. XIII.16). В ситуации, когда активными по отношению к электронному транспорту оказываются состояния групп I_n , сорванных с «зашелок», наблюдается обратная картина — резко возрастает эффективность реакции при $k_B T > \Delta F$.

Рассмотрим также вопрос о трансформации энергии, не связанной с напряжением конформации. Время конформационной релаксации τ , как уже отмечалось ранее, при значениях микровязкости белка $\eta \sim 10 \text{ Па} \cdot \text{с}$ и реальных амплитудах движения до нескольких десятых нанометра составляет вели-

чину $\sim 10^{-7}$ с. Это много больше, чем время колебательной релаксации ($\sim 10^{-12}$ с), однако слишком мало, чтобы в этом случае реализовалось стабильное запасание энергии химической реакции в напряжении конформации при отсутствии больших локальных барьеров на пути релаксации к равновесию.

Запасание энергии химической реакции может происходить и в отсутствие напряжения конформации, если трансформация энергии облегчает последующую реакцию за счет предыдущей. Рассмотрим уже знакомую простейшую

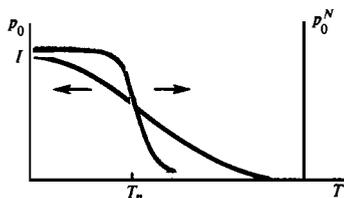


Рис. XIII.16.
Температурные зависимости функций

$$p_0 = [I + e^{\Delta F / (k_B T)}]^{-1} \text{ и } p_0^N \text{ при } N \gg 1$$

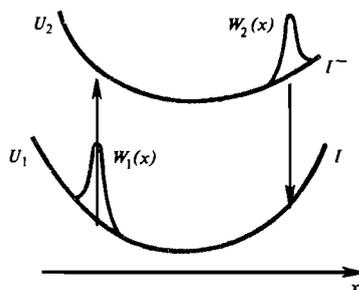


Рис. XIII.17.
Промотирование экзотермической реакции (в вакууме) $I \rightarrow A$ за счет изменения конформационной энергии групп I и I^- (по К. В. Шайтану, 1986)

ситуацию переноса электрона от D к A через интермедиат I (рис. XIII.17). Предположим далее, что реакция $D \xrightarrow{s} I$ в вакууме сильно экзотермична, а реакция $I^- \xrightarrow{s} A$ сильно эндотермична. В специфическом микроокружении, реализующемся в молекуле белка, за счет взаимодействия с отрицательно заряженными фиксаторами энергия иона I^- , во-первых, существенно отличается от его энергии в вакууме и, во-вторых, зависит от конформационной координаты. В ситуации, изображенной на рис. XIII.17, конформационная энергия иона I^- существенно выше, чем энергия незаряженной группы. Однако реакция $D \xrightarrow{s} I$ будет возможна, если ее тепловой эффект покрывает эту разницу. С другой стороны, избыток конформационной энергии иона I^- , возникающий за счет взаимодействия с микроокружением, превращает вторую эндотермическую реакцию в экзотермическую. Иными словами, энергия, выделяющаяся на первой стадии процесса, способствует протеканию последующей стадии. Запасание энергии происходит здесь не в напряжении конформации, так как на конформационных потенциалах I и I^- отсутствуют локальные минимумы; оно является следствием резкого изменения взаимодействия группы I с микроокружением при изменении зарядового состояния.

Рассмотрим другой случай использования одной химической реакции для ускорения последующей реакции, который явным образом связан с изменением конформации. Пусть конформационный потенциал группы I имеет два минимума, разделенных относительно высоким потенциальным барьером (рис. XIII.18). Допустим, что в начальный момент времени система находилась в конформации I , в которой возможно протекание первой реакции $D \xrightarrow{s} I$. Если барьер для группы I обусловлен взаимодействием с положительно заряженной группой, то конформационный потенциал для I^- скорее всего не будет содержать локального барьера и группа I^- легко попадет в область 2, где произойдет

следующая реакция $I \xrightarrow{-e} A$, и система окажется локализованной в правой «яме» (рис. XIII.18). Следовательно, в данном случае химические реакции выполнили функцию переключения системы из конформации 1 в конформацию 2. Если некоторая последующая реакция группы 1 происходит в конформации 2, то последовательность реакций $D \rightarrow I \rightarrow A$ ускоряет этот процесс за счет переключения системы в нужную конформацию ($I \rightarrow 2$).

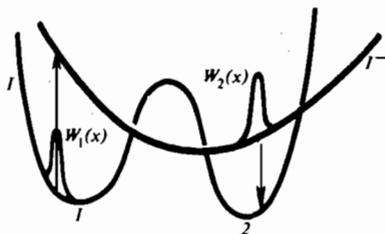


Рис. XIII.18.
Переключение конформации $I \rightarrow 2$ группы 1 за счет химической реакции

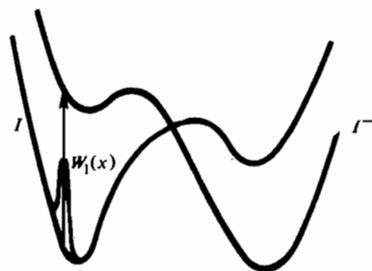


Рис. XIII.19.
Конформационный переход, индуцированный восстановлением группы I

Похожая ситуация может реализоваться и за счет одной реакции в случае, изображенном на рис. XIII.19, где конформационные переходы потенциала I и I^- имеют резко различные минимумы и переходы $I \rightleftharpoons I^-$ приводят к переключению конформации этой системы и способствуют реакциям, которые происходят в соответствующей конформации 2.

Таким образом, существуют весьма разнообразные механизмы связи конформационной подвижности и функционирования белков. В рамках этих представлений проблема запасаения и превращения энергии химических реакций при функционировании биологических систем сводится практически к двум аспектам: во-первых, ее непосредственное запасаение в виде потенциальной энергии взаимодействия групп с микроокружением и, во-вторых, изменение конформаций за счет химических реакций. Очевидно, могут действовать и оба фактора одновременно, причем строго определенная последовательность переключения конформаций в ходе взаимно прототирующих химических превращений может в принципе привести к глобальному изменению конформации биомолекулы.

§ 9. Индуктивно-резонансный механизм

Механизмы миграции энергии электронного возбуждения. Трансформация электронной энергии в биоструктурах связана не только с переносом электрона, но и с миграцией энергии электронного возбуждения, которая не сопровождается отрывом электрона от молекулы донора. Эти процессы имеют важное биологическое значение в фотобиологии, определяя распределение энергии возбуждения между хромофорами.

Основные физические идеи, лежащие в основе моделей миграции энергии возбуждения, близки к представлениям о переносе электрона в двухуровневой системе. В зависимости от характера взаимодействия возбужденной молекулы донора и невозбужденной молекулы акцептора осуществляются разные механизмы миграции.

Существует несколько различных механизмов миграции энергии электронного возбуждения, из которых важное значение в биологических системах имеют индуктивно-резонансный, обменно-резонансный и экситонный. В § 2 гл. XIII были рассмотрены общие закономерности переноса возбуждения от возбужденной молекулы донора к молекуле акцептора в двухуровневой системе. Физическая причина переноса возбуждения и перехода системы (XIII.2.1) $(D^*A) \rightarrow (DA^*)$ из начального (i) в конечное (f) состояние определяется природой взаимодействия V_{if} . Перенос возбуждения на расстояния, много меньшие длины волны излучения, происходит обычно за счет кулоновского взаимодействия между электронами в разных молекулах. В течение временной жизни возбужденного состояния молекулы D^* за счет взаимодействия дипольных моментов перехода соседних молекул (см. (XII.1.24)) происходит переход акцептора в возбужденное и возвращение донора в основное состояние, т. е. безызлучательный перенос энергии. В двухуровневой системе необратимый характер переноса энергии определяется релаксационными потерями энергии за счет связи системы с внешней средой. Эти процессы деградации энергии с уровня конечного состояния системы (DA) определяют конечную ширину уровня (Γ) и общее время распада исходного состояния при необратимом переносе энергии.

В сложных люминесцирующих молекулах ширина энергетического уровня определяется в основном временем электронно-колебательного взаимодействия, диссипацией электронной энергии по колебательным степеням свободы и колебательной релаксацией. В этом случае в формуле (X.2.21) или (XIII.4.3) для ширины энергетического уровня

$$\Gamma = 1/T_2 \sim 1/T_2^* + 1/(2T_1)$$

величина T_1 определяется временем τ^* электронного перехода из возбужденного в основное состояние, а T_2^* соответствует времени колебательной релаксации $T_2^* \sim \tau_{\text{кол}}$. Так как $\tau_{\text{кол}} \ll \tau^*$, то, следовательно, ширина уровня зависит в основном от внутримолекулярных диссипативных процессов, т. е. при слабых взаимодействиях

$$1/\Gamma \sim T_2 \sim \tau_{\text{кол}} \quad (\text{XIII.9.1})$$

Индуктивно-резонансный механизм осуществляется при условии слабого взаимодействия между молекулами, когда энергия взаимодействия ($E_{\text{вз}} < 10 \text{ см}^{-1} \sim 10^{-3} \text{ эВ}$) такова, что

$$E_{\text{вз}} = \sim |V_{if}| \ll \hbar/T_2, \quad (\text{XIII.9.2})$$

где V_{if} определяется в (XIII.2.9).

Время переноса, или время миграции, энергии (τ_m) в этом случае

$$\tau_m \sim \hbar/E_{\text{вз}} \quad (\text{XIII.9.3})$$

намного превышает время колебательной релаксации ($T_2 \sim \tau_{\text{кол}}$):

$$\tau_{\text{кол}} \sim T_2 \ll \tau_m \sim \hbar/E_{\text{вз}} \quad (\text{XIII.9.4})$$

Перенос осуществляется с возбуждением колебательных подуровней, а колебательная релаксация успевает пройти намного быстрее, чем может осуществиться обратный перенос энергии возбуждения. Иными словами, здесь можно пренебречь заселенностью уровня конечного состояния и рассматривать обратный перенос, если он возможен энергетически, как не зависящий от прямого. В этом случае деградация энергии возбуждения в доноре и акцепторе происходит также независимо друг от друга. Возбужденная молекула акцептора релаксирует на нижний колебательный подуровень

синглетного возбужденного состояния (S^*), откуда излучается свет флуоресценции. За время τ_D средней длительности состояния (S^*) донора энергии возбуждение за счет диполь-дипольного взаимодействия передается на акцептор с переводом его на один из верхних колебательных подуровней состояния S_1 с последующей релаксацией за время $\tau_{\text{кол}} \sim 10^{-12} \div 10^{-13}$ с и переходом на нижние колебательные уровни того же состояния S_1 .

Таким образом, перенос осуществляется за время большее, чем тепловая релаксация избыточной колебательной энергии. Такой механизм переноса энергии называется индуктивно-резонансным. Классический его аналог — модель двух механически связанных маятников, в которой возбуждение одного передается другому. В данном случае осуществляется связь двух осцилляторов через электромагнитное поле, генерируемое возбужденной молекулой донора. Впервые количественно этот механизм был исследован Т. Ферстером в 1948 г. В модели Ферстера широкие сплошные спектры рассматриваются как непрерывные, а для скорости переноса энергии используется известное выражение теории возмущений для вероятности перехода в непрерывном спектре (см. (XIII.4.1))

$$dW = \frac{2\pi}{\hbar} |V_{if}|^2 \delta(\Delta E), \quad (\text{XIII.9.5})$$

где $\Delta E = (E_D^0 - E_D^1) - (E_A^0 - E_A^1)$, а $|V_{if}|^2$ — квадрат матричного элемента энергии диполь-дипольного взаимодействия начального (i) и конечного (f) состояний. Функции Ψ_i и Ψ_f строятся в адиабатном приближении как произведение электронной волновой функции φ на колебательную χ (XIII.5.5). В одно-электронном приближении, согласно принципу суперпозиции (см. (XII.1.25)), волновые функции начального и конечного состояний можно записать так:

$$\begin{aligned} \Psi_i &= \frac{1}{\sqrt{2}} [\varphi_D^1(1) \varphi_A^0(2) - \varphi_D^1(2) \varphi_A^0(1)] \chi_i(E_D^1) \chi_A(E_A^0); \\ \Psi_f &= \frac{1}{\sqrt{2}} [\varphi_D^0(1) \varphi_A^1(2) - \varphi_D^0(2) \varphi_A^1(1)] \chi_f(E_D^0) \chi_i(E_A^1). \end{aligned} \quad (\text{XIII.9.6})$$

Матричный элемент взаимодействия V_{if} в приближении Кондона при слабой зависимости электронного состояния от координат ядер имеет вид

$$\begin{aligned} V_{if} &= \langle \Psi_i | V | \Psi_f \rangle = \{ \langle \varphi_D^1(1) \varphi_A^0(2) | V | \varphi_D^0(1) \varphi_A^1(2) \rangle - \\ &\quad - \langle \varphi_D^1(1) \varphi_A^0(2) | V | \varphi_D^0(2) \varphi_A^1(1) \rangle \} F_{if}, \end{aligned} \quad (\text{XIII.9.7})$$

где первый член в правой части учитывает кулоновскую, а второй соответствует обменной части взаимодействия электронов донора и акцептора; F_{if} — интеграл перекрывания колебательных волновых функций состояний i и f (см. (XIII.5.8)).

На относительно больших расстояниях между D и A , когда перекрыванием их волновых функций можно пренебречь, обменная часть матричного элемента значительно меньше кулоновской:

$$| \langle \varphi_D^1(1) \varphi_A^0(2) | V | \varphi_D^0(1) \varphi_A^1(2) \rangle | \gg | \langle \varphi_D^1(1) \varphi_A^0(2) | V | \varphi_D^0(2) \varphi_A^1(1) \rangle |. \quad (\text{XIII.9.8})$$

Перенос энергии по индуктивно-резонансному механизму разрешен спиновыми правилами отбора, предполагающими сохранение состояния спина электрона при переносе энергии возбуждения: $s_D^1 = s_D^0$ и $s_A^1 = s_A^0$, где s — спиновая волновая функция.

Вероятность переноса энергии для диполь-дипольного межмолекулярного взаимодействия имеет вид

$$W_k = \frac{k f(\varphi, \Theta)}{\tau_0 R^6} \int_V \frac{1}{V^4} \varepsilon(V) f(V) dV, \quad (\text{XIII.9.9})$$

где k — коэффициент, зависящий от свойств среды (от показателя преломления); $f(\varphi, \Theta)$ — фактор взаимного расположения переходных диполей донора и акцептора; $\tau_0^* = 1/\rho$ — излучательное время жизни донора в состоянии S^* ; ρ — вероятность флуоресценции; R — расстояние между взаимодействующими молекулами; $\varepsilon(V)$ и $f(V)$ — нормированные к единичной площади спектры излучения донора и поглощения акцептора, см^{-1} .

Как видно, вероятность переноса пропорциональна $1/R^6$, что характерно для диполь-дипольных взаимодействий (см. § 1, гл. VIII), и интегралу перекрытия спектра поглощения акцептора и спектра излучения донора. Последнее обстоятельство отражает наличие широких спектров взаимодействующих молекул, и приближение двухуровневой системы с резонансным переносом энергии между уровнями уже несправедливо. Расстояния, на которых одинаково эффективно происходит как перенос энергии, так и люминесценция, составляют около 3—10 нм. Скорости передачи энергии по индуктивно-резонансному механизму 10^6 — 10^{11} с^{-1} . Вероятность переноса энергии по этому механизму падает с понижением температуры вследствие сужения ширины спектральных полос и уменьшения интеграла их перекрытия. Выражение для зависимости вероятности переноса энергии между одинаковыми молекулами от температуры при ферстеровском механизме имеет вид

$$W = W_0 e^{-E_a/(k_B T)}, \quad (\text{XIII.9.10})$$

где $W_0 = \Phi(R) \chi_0 / (\sqrt{2} \omega_0^2)$ — константа, зависящая от фактора расстояния между молекулами ($\Phi(R)$), интенсивности поглощения (χ_0), положения максимума спектра поглощения (ω_0); E_a — энергия активации процесса переноса.

Общим критерием применимости теории Ферстера являются условия слабого взаимодействия и быстрой релаксации. Как предполагают, колебательные волновые функции взаимодействующих молекул независимы, что может быть, однако, несправедливо для молекул, расположенных вблизи друг от друга. Кроме того, на расстояниях, меньших в 5—10 раз, чем R_0 , т. е. при $R \sim 0,3$ — $1,0$ нм, условие малости взаимодействия уже не выполняется. Следовательно, на расстояниях порядка диаметра молекул в растворах или порядка постоянной решетки в кристаллах приближение, основанное на малости взаимодействия, может быть несправедливо.

Индуктивно-резонансная миграция возможна не только между синглетными уровнями донора и акцептора. Доказано также существование интеркомбинационно запрещенных процессов переноса энергии: триплет-синглетного и синглет-триплетного, когда нарушается правило сохранения спина в системе. На рис. XIII.20 показана схема электронных уровней молекул донора и акцептора энергии при триплет-синглетном переносе энергии. Процесс переноса здесь, запрещенный по спину, успешно конкурирует с интеркомбинационным также запрещенным переходом в доноре с триплетного в основное состояние с излучением фосфоресценции или деградацией в тепло-

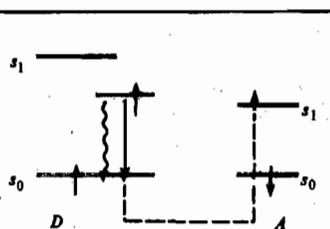


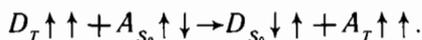
Рис. XIII.20. Уровни в триплет-синглетном переносе энергии

ту. Такой процесс должен осуществляться на расстояниях 2,5—5,0 нм, характерных для индуктивно-резонансного механизма. Внутримолекулярная миграция энергии обнаружена у белков, пигментов, коферментов, хромопротеинов.

Помимо приведенных в § 1 этой главы примеров известен ряд донорно-акцепторных пар, в которых осуществляется индуктивно-резонансная миграция: ароматические аминокислоты белка → фикобилины (фикоэритрин и фикоцианин, являющиеся фотосинтетическими пигментами красных и синезеленых водорослей); тирозин → триптофан, триптофан → триптофан, триптофан → ионизированный тирозин в различных белках, ароматические аминокислоты → краситель в комплексах белок — краситель; адениловое → никотинамидное кольцо в НАД; тиазоновое → пиримидиновое кольцо в тиамине (витамин В₁) и др. Межмолекулярный перенос столь же распространен в биологических системах, примером чего служит миграция энергии между различными пигментами в фотосинтетических мембранах.

§ 10. Обменно-резонансный перенос энергии

Безызлучательный перенос энергии может происходить не только по синглетным, но и по триплетным уровням энергии молекул. Впервые доказательства такого переноса были получены А. Н. Терениным и В. Л. Ермолаевым для твердых растворов красителей. Формально схему переноса можно представить в виде



Как видно (рис. XIII.21), перенос происходит с обращением спина электрона в молекуле D и A . Переходы ($S \rightarrow T$) между уровнями разной мультиплетности в органических молекулах в 10^6 — 10^9 раз менее вероятны в силу правил запрета, чем переходы между уровнями одной мультиплетности ($S \rightarrow S_0$, $T \rightarrow T_1$). Поэтому в таких случаях кулоновская часть в V_{ij} (см. (XIII.9.7)) будет сама по себе чрезвычайно малой, а основной вклад может дать уже обменный интеграл, который и определяет переходы между состояниями

$$\varphi_D^T(1)\varphi_A^0(2) \rightarrow \varphi_D^0(2)\varphi_A^T(1),$$

где φ_D^T и φ_A^T — триплетные состояния D и A .

Записывая электронные волновые функции донора и акцептора в виде произведения координатной волновой функции $\varphi(r)$ на спиновую s , можно преобразовать обменный интеграл к виду

$$I_{\text{обн}} = \langle \varphi_D^1(r_1)\varphi_A^0(r_2) | V | \varphi_D^0(r_2)\varphi_A^1(r_1) \rangle \langle S_D^1(1) | S_A^1(1) \rangle \langle S_A^0(2) | S_D^0(2) \rangle. \quad (\text{XIII.10.1})$$

Отсюда следует, что $I_{\text{обн}} = 0$ только тогда, когда

$$\langle S_D^1(1) | S_A^1(1) \rangle = \langle S_A^0(2) | S_D^0(2) \rangle \neq 0,$$

т. е. при обмене электронами их спины сохраняются. При этом может случиться, что основное и возбужденное состояния как донора, так и акцептора имеют разную мультиплетность:

$$\langle S_D^1(1) | S_D^0(1) \rangle = \langle S_A^1(2) | S_A^0(2) \rangle = 0, \quad (\text{XIII.10.2})$$

что наблюдается при триплет-триплетном обменно-резонансном переносе.

Таким образом, обмен электронами между D и A в конечном состоянии приводит к обмену и их спиновыми состояниями. Это учитывается правилом

(XIII.10.2) одновременного изменения мультиплетности донора и акцептора и сохранением суммарного спина системы в процессе переноса энергии (рис. XIII.22). Эти взаимодействия называются обменно-резонансными.

Физическая причина обменно-резонансного взаимодействия заключается в перекрывании электронных волновых функций донора и акцептора. Перенос по этому механизму может осуществляться на расстояниях порядка

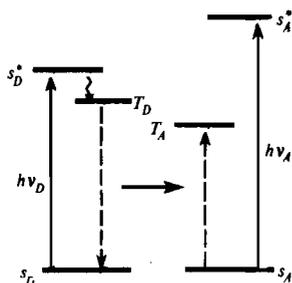


Рис. XIII.21.
Схема триплет-триплетного переноса энергии (по А. Н. Теренину, В. Л. Ермолаеву, 1952)

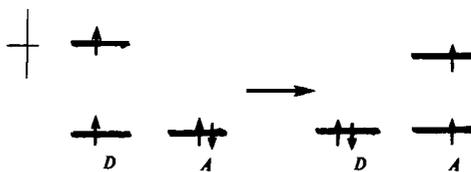


Рис. XIII.22.
Сохранение спина в триплет-триплетном переносе

длины химической связи, т. е. 0,1—0,3 нм. Вероятность перехода по обменно-резонансному механизму задается выражением

$$W(R) = \frac{2\pi}{\hbar} e^{-2R/L} \int f_D(E) \varepsilon_A(E) dE, \quad (\text{XIII.10.3})$$

где L — средний эффективный борковский радиус (0,11—0,19 нм для ароматических молекул); $\varepsilon_A(E)$ — нормированный спектр поглощения акцептора ($\int \varepsilon_A(E) dE = 1$); $f_D(E)$ — нормированный спектр люминесценции донора. Экспоненциальная зависимость $W(R)$ определяется соответствующим убыванием с расстоянием волновой функции электрона.

Обменно-резонансный механизм может осуществляться при синглет-синглетном переносе, когда молекулы образуют обменный комплекс. Особый интерес представляет обменно-резонансная миграция, идущая с нарушением правила (см. (XIII.10.2)) сохранения спина в системе, которая включает триплет-синглетный и синглет-триплетный переносы. Так, синглет-триплетный ($D_{S_1} + A_{S_0} \rightarrow D_{S_0} + A_T$) перенос наблюдается в отсутствие синглет-синглетного переноса энергии от донора к акцептору. Константы скорости этого переноса пропорциональны квадрату спин-орбитального фактора в участвующих в переносе энергии молекулах. Это означает, что причиной переноса энергии в этом случае являются обменно-резонансные взаимодействия, запрещенные по спину и происходящие тем не менее благодаря спин-орбитальному взаимодействию, снимающему запрет с интеркомбинационных синглет-триплетных переходов в молекуле. Примером служит обменно-резонансный перенос энергии в фотосинтетических мембранах от хлорофилла в состоянии S_1 на триплетный уровень каротиноидов.

§ 11. Экситонный механизм

До сих пор рассматривался случай миграции энергии при относительно слабых взаимодействиях, когда время переноса было велико по сравнению с временем (T_2) внутримолекулярной деградации ($\tau_m \gg T_2$). Если, однако, энергия взаимодействия ($E_{вз}$) между молекулами значительна, а время переноса ($\tau_m \sim \hbar/E_{вз}$) относительно мало по сравнению с T_2 , то вместо (XIII.9.4) имеем соотношение

$$\tau_{кол} \sim T \gg \tau_m \sim \hbar/E_{вз}. \quad (\text{XIII.11.1})$$

В этом случае становится возможным бездиссипативный перенос энергии в кристаллах, где из-за трансляционной симметрии возможно возбуждение коллективных состояний. Тогда возбуждением одновременно охватывается несколько сотен молекул. В силу (XIII.11.1) время колебательной релаксации по подуровням состояния S_1 существенно больше, чем время переноса τ_m . Возбуждение как бы «бежит» по верхним колебательным подуровням взаимодействующих молекул, не успевая локализоваться на каждой из них в отдельности. В каждой из молекул возбуждение пребывает в течение времени, намного меньшего времени внутримолекулярной колебательной релаксации изолированной молекулы (рис. XIII.23). При энергиях взаимодействия молекул порядка $E_{вз} \sim 100 \text{ см}^{-1} (\sim 0,01 \text{ эВ} \sim 4,6 \cdot 10^{-21} \text{ Дж})$ время миграции энергии (τ_m) можно оценить как $\tau_m \sim \hbar/E_{вз} \sim 10^{-13} \div 10^{-14} \text{ с}$, что меньше времен колебательной релаксации ($\sim 10^{-12} \text{ с}$) сложных флуоресцирующих молекул красителей.

Такой тип миграции возбуждения называется экситонным, а сама область возбуждения, охватывающая одновременно большое число молекул, — экситоном (см. § 2, гл. XII).

Экситон образуется при поглощении света молекулярными кристаллами, когда электромагнитное поле световой волны с длиной λ может одновременно вызывать когерентное возбуждение и смещение зарядов в ряду тесно расположенных молекул ($\lambda \gg a$, где a — среднее межмолекулярное расстояние). Сильное взаимодействие соседних молекул вызывает корреляцию смещений их зарядов, т. е. образование волны возбуждения, или волнового пакета, охватывающего таким образом сразу большое число молекул. Распространение экситона фактически равносильно расплыванию этого волнового пакета.

Подчеркнем еще раз, что в данном случае рассматривается когерентное возбуждение большого числа молекул, или когерентный экситон, когда время переноса возбуждения (τ_m) намного меньше времени внутримолекулярной колебательной релаксации ($\tau_m \ll T_2$). Именно большая величина T_2 по сравнению с τ_m и обеспечивает сохранение фазы возбуждения соседних молекул и образование когерентного экситона. Наличие резонансного взаимодействия между возбужденными молекулами, при котором целая область переходных диполей движется в одной фазе, проявляется в сдвиге и расщеплении полосы поглощения (см. § 2, гл. XII).

До сих пор не учитывали экситон-фононного взаимодействия, приводящего к деформации молекул, поскольку считали, что время ($\tau_{деф}$) смещения атомов и переход молекул в новые равновесные состояния при их возбуждении намного больше, чем время миграции экситона ($\tau_m \ll \tau_{деф}$). Фактически это равносильно условию образования когерентного экситона ($T_2 \gg \tau_m$), поскольку именно относительная медленность релаксационных процессов перераспределения энергии по колебательным подуровням по сравнению с переносом возбуждения обуславливает неизменность скелета молекул. Может быть, однако, что энергия ($E_{деф}$) локального деформационного изменения в моле-

куле такова, что характерное время атомных смещений ($\tau_{\text{деф}} \sim \hbar/E_{\text{вз}}$) становится меньше $\tau_{\text{м}}$, т. е.

$$\tau_{\text{м}} \geq \tau_{\text{деф}} \quad (\text{XIII.11.2})$$

при $E_{\text{вз}} \leq E_{\text{деф}}$. В этом случае появляющаяся локальная деформация перемещается вместе с возбуждением по кристаллу, а сам экситон называется «локализованным» или некогерентным. Движение некогерентного экситона носит характер случайных скачков и уже не может быть описано в терминах распылвания волнового пакета. Наличие экситон-фононной связи приводит к рассеянию некогерентных экситонов в узлах решетки кристаллов, уменьшая длину их свободного пробега, а также может изменять спектр экситонных состояний. Константа миграции ($K_{\text{м}}$) когерентного экситона при условии сильных взаимодействий зависит от энергии взаимодействия

$$K_{\text{м(ког)}} = 4E_{\text{вз}}/\hbar \quad (E_{\text{вз}} > 100 \text{ см}^{-1}), \quad (\text{XIII.11.3})$$

а для некогерентного экситона

$$K_{\text{м(неког)}} = (4E_{\text{вз}}/\hbar)F_{\text{vv}}^S, \quad (E_{\text{вз}} \sim 10 \div 100 \text{ см}^{-1}), \quad (\text{XIII.11.4})$$

где множитель F_{vv}^S — квадрат матричного элемента взаимодействия между колебательными уровнями основного и возбужденного электронных состояний и отражает наличие экситон-фононного взаимодействия. Таким образом, вероятность миграции некогерентного экситона зависит от франк-кондоновского интеграла перекрытия колебательных волновых функций возбужденного и невозбужденного состояний. Время миграции некогерентного экситона снижается до $10^{-12} - 10^{-13}$ с.

Распространение когерентных экситонов можно представить в виде диффузии экситонного возбуждения по кристаллу. Оно характеризуется выражением

$$L = \sqrt{D\tau_0}, \quad (\text{XIII.11.5})$$

где L — длина диффузионного смещения; D — коэффициент диффузии; τ_0 — время жизни экситона. Так, для синглетных экситонов в молекулярных кристаллах при $\tau_0 \sim 10^{-8}$ с, $D \sim 10^{-3} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, величина $L \sim 50$ нм.

Перенос некогерентного экситона носит активационный характер, поскольку в этом случае матричные элементы резонансного взаимодействия относительно малы, а процесс переноса в основном зависит от деформационных смещений

$$D \sim e^{-E_a/(\hbar_B T)}, \quad (\text{XIII.11.6})$$

где E_a — энергия активации перескока некогерентного экситона. Наоборот, для когерентного экситона коэффициент диффузии падает с ростом температуры

$$D \sim 1/\sqrt{T}, \quad (\text{XIII.11.7})$$

поскольку при этом возрастает вероятность рассеяния на фононах.

Таким образом, отличие механизмов переноса возбуждения когерентными и некогерентными экситонами проявляется в температурной зависимости коэффициента диффузии. Понижение температуры наряду с замедлением

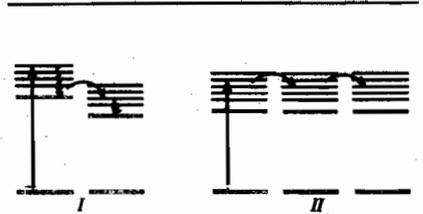


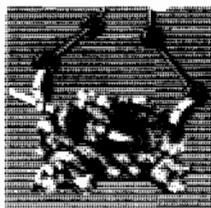
Рис. XIII.23. Индуктивно-резонансный (I) и экситонный (II) перенос энергии

миграции некогерентного окситона может сильно замедлить деформационные изменения в молекулах и тем самым увеличить $D_{\text{деф}}$, так что $\tau_{\text{деф}} > \tau_{\text{м}}$. Иными словами, при понижении температуры некогерентный экситон может превратиться в когерентный. Процесс захвата экситонов в ловушках сопровождается смещением равновесных конфигураций молекул и испусканием (поглощение) фонона в решетке и, вообще говоря, зависит от температуры.

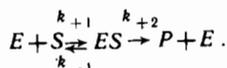
Как будет показано ниже (см. гл. XXVII), характер распространения и тушения возбуждения в фотосинтетической светособирающей матрице в ряде случаев существенно зависит от температуры. Как правило, в биологических объектах характер влияния температуры на процесс миграции энергии, в основном, определяется зависимостью конформационного состояния белкового носителя от температуры. С температурой меняется расстояние и взаимная ориентация фиксированных на белке хромофорных групп, которые непосредственно передают энергию возбуждения (молекулы хлорофилла в фотосинтетической мембране, ароматических аминокислот в белке). При этом происходит изменение характера (энергии) взаимодействия хромофорных групп, что в принципе может менять также и самый механизм миграции электронного возбуждения.

Глава XIV

Механизмы ферментативного катализа



Общая схема ферментативного катализа, предложенного Л. Михаэлисом, состоит, как известно, из следующих стадий: образование фермент-субстратного комплекса (ES), превращение субстрата в продукт (P) и, наконец, десорбция продукта с фермента и восстановление последнего в первоначальное состояние (E). В гл. I—IV были рассмотрены вопросы кинетики и регуляции ферментативных реакций, протекающих по уравнению



Специфика действия фермента заключается, очевидно, в реакции распада комплекса (ES) $\xrightarrow{k_{+2}} P + E$, т. е. в механизмах процессов, протекающих в активном центре фермента, где происходит трансформация субстрата в продукты реакции. Теория ферментативного катализа в современной биофизике еще не сформулирована в окончательном виде. Тем не менее изложенные в предыдущих главах представления о динамической организации белков и электронно-конформационных взаимодействиях находят широкое применение в этой области.

§ 1. Физико-химическое описание и биофизические модели ферментативных процессов

Термодинамика ферментативного катализа. Известно, что ферменты ускоряют реакции, увеличивая их константы скорости. Обычно рассмотрение этого эффекта проводят в рамках теории переходного состояния, или активированного комплекса (рис. XIV.1). Считают, что реагенты, находящиеся исходно в основном состоянии, образуют комплекс, который активируется с образованием переходного состояния. Этому состоянию соответствует максимум на кривой изменения энергии реагентов вдоль координаты реакции. Продукты реакции возникают при движении вдоль координаты реакции из переходного состояния. В теории активированного комплекса предполагают, что существует термодинамическое равновесие между переходным и основным состояниями, которому соответствует константа равновесия, равная отношению концентраций активных комплексов и исходных реагентов. Тогда по разности свободных энергий этих состояний можно найти концентрацию переходного комплекса, а затем скорость реакции путем умножения этой концентрации на константу скорости его распада.

Пусть разность значений полного термодинамического потенциала G (см. гл. V) для переходного и основного состояний равна ΔG^* . Тогда константа скорости распада переходного комплекса, или константа реакции, будет равна

$$k_1 = \kappa \frac{k_B T}{\hbar} e^{-\Delta G^*/(RT)}, \quad (\text{XIV.1.1})$$

где κ — трансмиссионный коэффициент (~ 1); $k_B T/\hbar = \omega$ определяет частоту тепловых флуктуаций. При $k_B T \approx 0,025$ эВ ω равна 10^{13} с^{-1} , а соответственно время сохранения переходного состояния составляет $\approx 10^{-13}$ с.

Представляя изменение ΔG^* для образования активного комплекса в виде

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^*, \quad (\text{XIV.1.2})$$

где ΔH^* — энтальпия активации, а ΔS^* — энтропия активации, вместо (XIV.1.1) имеем при $\kappa \sim 1$

$$k_1 = \frac{k_B T}{\hbar} e^{\Delta S^*/R} e^{-\Delta H^*/RT}. \quad (\text{XIV.1.3})$$



Рис. XIV.1.
Изменение энергии реагентов
вдоль координаты реакции

При образовании активного комплекса происходит снижение энтропии ($\Delta S^* < 0$) вследствие формирования вполне определенной взаимной ориентации молекулярных групп реагентов по сравнению с их хаотическим расположением в исходном состоянии. Таким образом, энтропийный ($\Delta S^* < 0$) и энергетический ($\Delta H^* > 0$) факторы действуют в направлении снижения скорости реакции ($e^{\Delta S^*/R} \ll 1$; $e^{-\Delta H^*/R} \ll 1$).

Ускорение ферментативных реакций по сравнению с соответствующими неферментативными означает на языке формальной кинетики, что величина активационного барьера ΔG^* в ферментативных реакциях снижается ($\Delta G_e^* < \Delta G_0^*$). Это может происходить за счет снижения абсолютной величины

$\left| \frac{\Delta S_e^*}{R} \right| < \left| \frac{\Delta S_0^*}{R} \right|$ а также за счет уменьшения энтальпии активации $\left| \Delta H_e^* \right| < \left| \Delta H_0^* \right|$ (индексы e и 0 относятся соответственно к ферментативным и неферментативным реакциям).

Понижение энтропийной части происходит в результате фиксации субстрата на ферменте в конфигурации активных групп, обладающей и более низкой энтропией по сравнению со свободным сочетанием реагентов. Следовательно, в таком комплексе, исходно близком к переходному состоянию, уменьшение энтропии при образовании самого переходного состояния не должно быть уже столь большим по абсолютной величине, как в случае свободных реагентов. Значит, роль энтропийного фактора ($e^{\Delta S^*/R} \ll 1$) в (XIV.1.1), снижающего скорость реакции, уменьшается в ферментативном процессе по сравнению с обычной реакцией. Избыток энергии, выделяющейся при связывании субстрата, должен хотя бы частично переходить в теплоту, чтобы скомпенсировать уменьшение энтропии при образовании комплекса. С энергетической точки зрения, происходящая стабилизация и уменьшение собственной энергии комплекса должны были бы замедлять катализ, где требуется преодоление активационного барьера. Однако в схемах энергетического катализа предполагают, что осуществляется не только фиксация конфигурации субстрата, но и создание напряжения фермент-субстратного комплекса, способствующего реакции. При этом происходит и снижение энергии активации химической реакции за счет концентрации энергии напряжения на атакуемой связи. Энергия, необходимая для создания такого напряженного состояния связи, черпается из энергии сорбции, которая, как предполагают, не расходуется полностью в теплоту, а может быть запасена в белко-

вой части фермента и сконцентрирована в области образовавшихся фермент-субстратных контактов.

Модели ферментативного катализа. В известных в биохимии моделях ключ-замок Фишера и рука-перчатка Кошланда учитываются энтропийные факторы в катализе введением условия комплементарности фермента субстрату, точнее, переходному состоянию субстрата. В модели рука-перчатка, или индуцированного соответствия, в отличие от модели ключ-замок, не предполагают необходимости исходной жесткой комплементарности, а считают, что каталитически активная конформация активного центра образуется в процессе взаимодействия ферментов и субстрата в фермент-субстратном комплексе. Эта напряженная конформация энергетически менее выгодна (более

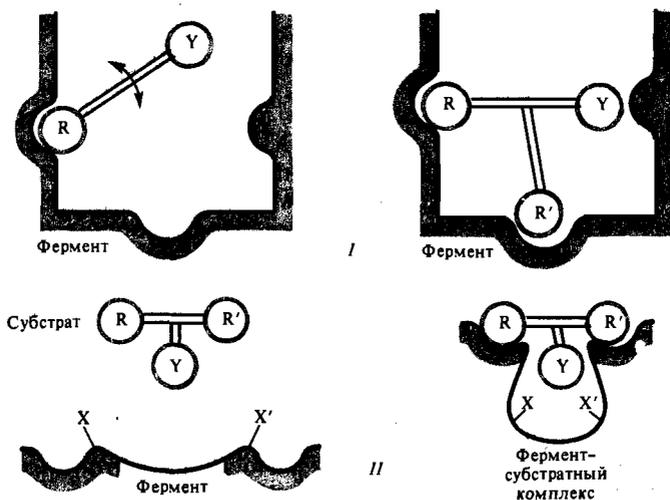


Рис. XIV.2. Эффекты сближения и ориентации (I) и механизм индуцированного соответствия (II) (по И. В. Березину, К. Мартинеку, 1977)

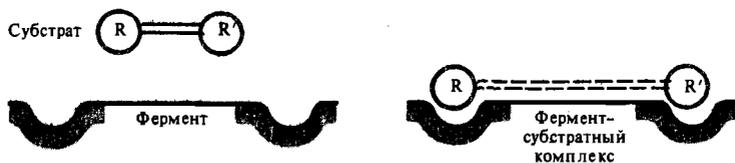


Рис. XIV.3. Механизм «напряжения» (по И. В. Березину, К. Мартинеку, 1977)

высокая собственная энергия), и поэтому на ее образование тратится часть свободной энергии сорбции. Таким образом, большая часть энергии сорбции идет на термодинамически невыгодное сближение и ориентацию реагирующих групп (рис. XIV.2).

Сорбционное взаимодействие между реагентами, которое вызывает ускорение ферментативной реакции, может быть гидрофобным, электростатическим или зависеть от образования водородных связей. Так, «погружение» бензильной группы субстрата из воды в гидрофобную среду активного центра

приводит к снижению энергии активации до $-29,4$ кДж/моль и ускорению реакции до 10^5 раз. Боковые группы субстратной молекулы могут взаимодействовать с белком при наличии противоположно заряженных групп в реагирующих частицах, что приводит к электростатической стабилизации переходного состояния (гидролиз трипсином метиловых эфиров).

Различные варианты самой простой модели понижения энергии активации в ферментативном катализе получили название модели «дыбы» (Г. Эйринг, Р. Ламри, Дж. Д. Спайкс). Здесь силы сорбции также идут на создание напряжений (деформаций), способствующих протеканию реакций (рис. XIV.3). Согласно модели «дыбы», для установления связей с ферментом субстрат претерпевает деформацию и активизируется. В реальных системах как молекулы субстрата, так и молекулы фермента могут претерпевать конформационные изменения, что свидетельствует об общности различных моделей ферментативного катализа.

В одной из последних моделей продолжен вариант «белок-машина» (Д. С. Чернавский) для объяснения эффекта запасаения энергии (рис. XIV.4). Резервуар, в котором запасается энергия, представлен пружиной, а переход энергии на атакуемую связь изображен как движение стержня. Отличие этой схемы от простой «дыбы» (см. рис. XIV.3) состоит в том, что запасаемая энергия расходуется не сразу, и не на первой, а на любой стадии процесса. Связывание происходит на некомплементарном ферменте. Важную роль играет здесь наличие выделенной степени свободы (см. § 1, гл. X), характерной для «машинных» механизмов. Источником энергии также являются сорбция субстрата, который вызывает статические напряжения в белковой части фермента. Таковы в основном распространенные физико-химические представления о механизмах катализа.

Термодинамическая сущность рассмотренных выше моделей состоит в том, что потенциальная свободная энергия связывания (сорбции) субстрата на ферменте должна тратиться на понижение барьера свободной энергии активации последующей химической реакции. Однако остается неясным, в какой конкретной форме и по каким механизмам энергия сорбции может запасаться в белковой глобуле и концентрироваться на атакуемой связи.

Проблема снижения энергетического барьера. С термодинамической точки зрения, конформационной энергии связывания может быть достаточно для деформации субстрата, однако, чтобы использовать эту энергию в разрыве сильных ковалентных связей в субстрате, необходимо, в свою очередь, образование других сильных связей. Возникает вопрос: какова природа предполагаемых напряженных конформационных состояний, которые должны вызывать столь существенные изменения энергии напряжения, и каковы вообще непосредственные доказательства их существования в фермент-субстратном комплексе? Именно в решении этого вопроса физико-химическое описание катализа встречается с серьезными трудностями.

Наиболее обширную информацию о фермент-субстратных взаимодействиях получают при исследовании кристаллических ферментов и их комплексов с ингибиторами и субстратами методом рентгеноструктурного анализа. Найденные этим способом координаты атомов фермента и субстрата затем оптимизируются путем минимизации энергетических потенциалов, задаваемых суммой атом-атомных взаимодействий (см. гл. VIII—IX). Построенные в результате энергетические карты (см. § 1, гл. IX) фермент-субстратных комплексов позволяют сравнивать конформации отдельных фрагментов белка и аминокислотных остатков в связанном и свободном состояниях. В настоящее время насчитывается сравнительно небольшое число таких исследований.

Метод теоретического конформационного анализа был использован для изучения невалентных взаимодействий α -химотрипсина с рядом простейших субстратов, лизоцима с триацетилглюкозаминном, рибонуклеазы с уридин—2, 3'-циклофосфатом, карбоксипептидазы А с пептидными и эфирными субстратами. К сожалению, в силу ограниченной точности этот метод не всегда дает однозначный ответ о наличии напряжений в комплексе. Тем не менее

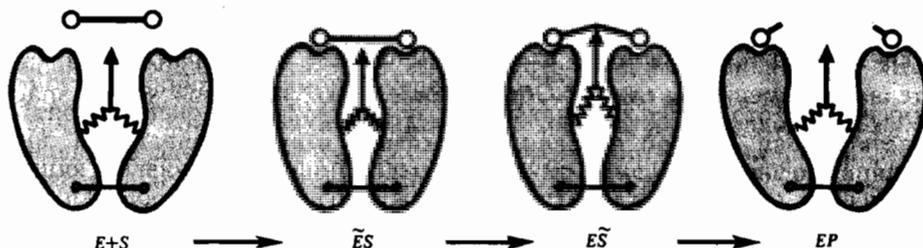


Рис. XIV.4.

Работа «белок-машины» (четыре основные стадии, по Д. С. Чернавскому, 1978)

общий вывод из проведенных теоретических исследований состоит в следующем. Хотя образование комплекса Михаэлиса сопровождается конформационными изменениями, однако посадка субстрата не вызывает в молекулах субстрата и фермента ни избыточного конформационного напряжения, ни образования какой-либо принудительной конформации. На α -химотрипсине было показано, что в предкаталитической стадии структурные элементы его активного центра находятся в ненапряженном состоянии.

В частности, потенциальная кривая боковой цепи *ser*-195 в активном центре α -химотрипсина (см. рис. XIV.11) содержит три неглубоких минимума (8—12 кДж/моль). Это показывает, что вращение вокруг связи $C^\alpha-C^\beta$ может происходить в широком интервале значений угла χ без серьезных стерических затруднений. При удалении воды (см. рис. XIV.11), что происходит при связывании субстрата, боковая цепь серина приобретает практически полную свободу вращения в интервале χ от -120 до 120° . Ее новое положение уже определяется стабилизирующим взаимодействием с расщепляемой группой субстрата. Кроме того, распределение по значению конформационной энергии остатков, непосредственно участвующих в фермент-субстратном связывании в α -химотрипсине, лизоциме или во взаимодействии с гемом в миоглобине, аналогично энергетическому распределению других остатков.

Было показано, что продуктивная конформация субстрата является, с одной стороны, самой предпочтительной по энергии невалентных взаимодействий с активным центром, а с другой — отвечает одной из наиболее низкоэнергетических форм свободной молекулы субстрата. Этот вывод подтверждается и в исследованиях конформаций субстрата при взаимодействии с активным центром лизоцима, а также в случае образования комплекса карбоксипептидазы А с пептидными и эфирными субстратами. Нужная для катализа взаимная ориентация и сближение расщепляемой связи субстрата и активных групп фермента происходят спонтанно и не требуют образования каких-либо энергетически неблагоприятных контактов.

В данном случае речь идет о конформационных напряжениях при невалентных взаимодействиях, которые должны были бы приводить к изменению

значений двугранных углов и расстояний между валентно несвязанными атомными группами. Изменения валентных углов в основной цепи, которые сопровождаются разрывом и образованием валентных связей в активном центре, относятся собственно к химическому акту катализа и будут рассмотрены ниже.

Таким образом, сама по себе напряженность конформации не является необходимым этапом, источником энергии и движущей силой катализа. Очевидно, в комплексе Михаэлиса сближение функциональных групп фермента и субстрата в конфигурации, необходимой для дальнейших электронных и химических взаимодействий, может достигаться за счет обычных внутримолекулярных движений различных структурных элементов с широким набором характерных времен (см. гл. X). Образование такой активной конфигурации, близкой к переходному состоянию, с формальной кинетической точки зрения, действительно снижает энтропийную часть барьера реакции, но это является спонтанным результатом внутримолекулярного динамического поведения разнородных, в том числе и функционально активных, молекулярных групп фермента и субстрата.

Согласно описанным моделям, катализ должен быть сопряжен также и со снижением самой высоты барьера активации. Рассмотрим существующие гипотезы о возможных механизмах непосредственного снижения барьера активации за счет запасания энергии в белковой глобуле и концентрации на атакуемой связи в субстрате. В модели упругой деформации (Д. С. Чернавский, Ю. И. Хургин, С. Э. Шноль) выдвигаются представления о молекуле белка как об упругой конструкции. Были рассчитаны размеры белкового резервуара для запасания необходимой в катализе энергии в виде энергии упругой деформации. Оказалось, что, если принять пределы упругости белкового тела примерно равными таковым для большинства материалов, то для запасания энергии $\Delta E \sim 0,5$ эВ необходимо распространение области упругой деформации на всю глобулу 2,0—5,0 нм.

Энергия деформации может возникать и при перемещении электрических зарядов в белковой глобуле вследствие изменения зарядового состояния активного центра в самом акте катализа. Предполагают, что она может храниться в глобуле до начала следующего акта. Расчеты показывают, что при размерах порядка $\leq 1,0$ нм электрическая энергия легко переходит в механическую и обратно, а плотности этих энергий уравниваются. Однако и здесь также необходимо констатировать отсутствие в настоящее время прямых доказательств запасания энергии упругих деформаций.

Обсуждают и другую возможность использования конформационной энергии в акте катализа за счет тепловых флуктуаций в структуре белка. В этих моделях речь идет не о статических напряжениях, а о передаче энергии тепловых колебаний по определенным степеням свободы с концентрацией ее на атакуемой связи в субстрате. Эти взгляды созвучны представлениям Р. Ламри (1959) о белке-ферменте как о «резервуаре избыточной тепловой энергии», в котором процессы, проходящие на поверхности белковой глобулы, служат источником свободной энергии, которая необходима для акта катализа.

В электромеханической модели предполагают, что под влиянием тепловых флуктуаций в белке возникают колебания, сопровождающиеся сдвигом электрических зарядов в активном центре и поляризацией атакуемых связей субстрата. В модели постулируют, что внутримолекулярные взаимодействия в белке стабилизируют на определенное время ($\geq 10^{-3}$ с) возникающую каталитически активную конформацию с поляризованными связями.

В других моделях также подчеркивают необходимость координации во

времени возникающих в белке тепловых конформационных флуктуаций и концентрации их энергии в активном центре белка. Вероятность возникновения тепловых флуктуаций в белке пропорциональна

$$W \sim e^{-(\Delta G)_\phi / (k_B T)}, \quad (\text{XIV.1.4})$$

где $(\Delta G)_\phi$ — изменение свободной энергии Гиббса в белке при флуктуации. Для акта катализа величина $(\Delta G)_\phi$ должна хотя бы на порядок превышать среднюю энергию тепловых колебаний $k_B T \sim 0,025$ эВ. Отсюда можно найти, что вероятность возникновения такой флуктуации (см. (XIV.1.4)) составит 10^{-5} в единицу времени, а за время оборота фермента 10^{-3} с такие флуктуации могут возникать примерно через $\sim 10^{-8}$ с.

Действительно, большое количество различных типов стохастических движений, проходящих вблизи поверхности раздела белок — растворитель (релаксация молекул связанной воды, локальные изменения конформации, флуктуации плотности зарядов в окружающем растворе ионов и др.), имеют времена корреляции в диапазоне 10^{-9} — 10^{-7} с. Для объяснения самого механизма катализа выдвигают предположение: фермент «устроен» так, что его структура обеспечивает когерентный характер распространения флуктуационных изменений конформации от поверхности белка к его активному центру. Тем самым обеспечивается и обмен свободной энергией между макромолекулой и ее окружением. В модели Сомоги и Дамьяновича (Somogyi, Damjanovich, 1975) молекулу фермента представляют в виде сопряженных осцилляторов, так что происходит направленный перенос энергии соударений с молекулами растворителя на поверхности белка в активный центр.

Основой всех рассмотренных «динамических» моделей является предположение о возникновении когерентного состояния с одной колебательной модой и бездиссипативном переносе энергии по белковой глобуле к активному центру по определенным степеням свободы. В результате энергия, как считают, концентрируется на атакуемой связи, что и приводит к уменьшению активационного барьера. В этом якобы и состоит «секрет» фермента. Однако непосредственных экспериментальных доказательств этого предположения в настоящее время не существует. Более того, существенная для всех этих моделей идея о направленной передаче и коммуляции энергии обычных тепловых флуктуаций тем или иным способом в активном центре противоречит второму началу термодинамики.

§ 2. Электронно-конформационные взаимодействия в ферментативном катализе

Как было показано, конформационные изменения в белковой глобуле носят релаксационный характер и характеризуются целым набором различных времен. Они происходят, как правило, намного медленнее, чем чисто электронные переходы. Быстрые изменения электронного состояния молекулы белка (например, восстановление атома Fe активного центра цитохрома) нарушают исходное равновесное конформационное состояние и приводят к каскаду последовательных конформационно-релаксационных актов, носящих направленный характер (см. § 1, гл. X). Именно это обстоятельство составляет физическую основу конформационно-релаксационной концепции ферментативного катализа (Л. А. Блюменфельд). Появление продукта реакции рассматривается здесь как закономерный результат электронно-конформацион-

ных взаимодействий в комплексе фермент — субстрат. Предполагают, что конформационные изменения фермент-субстратного комплекса, следующие за изменением электронного состояния субстрата в активном центре фермента, носят характер направленной релаксации и включают процессы превращения молекул субстрата в молекулы продукта. Элементарный акт ферментативной реакции заключается в конформационном изменении фермент-субстратного комплекса, а скорость превращения субстрат — продукт определяется скоростью этого конформационного изменения.

Последовательность событий представляется следующим образом. Изменение электронного состояния и локальные изменения геометрии активного центра и субстрата происходят за времена колебательной релаксации (10^{-12} — 10^{-13} с). Они затрагивают только часть молекулы — выделенные химические связи субстрата и функциональных групп активного центра, но не остальную большую часть белковой глобулы. Следовательно, в целом на этом этапе макромолекулярный комплекс находится в конформационно-неравновесном состоянии. Затем происходит медленная релаксация фермент-субстратного комплекса к новому равновесию и превращение субстрата в продукт:



где E^* — неравновесное, а \tilde{E} — новое равновесное конформационное состояние белковой глобулы фермента. Химическое изменение субстрата, включающее перегруппировку атомов вслед за разрывом химических связей, реализуется здесь как часть конформационного изменения макромолекулярного комплекса.

На следующей стадии происходит распад комплекса фермент — продукт: $E\tilde{P} \rightarrow \tilde{E} + P$. Эта стадия также сопровождается быстрыми локальными изменениями в активном центре и сольватационными изменениями продуктов реакции, переходящих в объем. Фермент остается в конформационном состоянии \tilde{E} , которое после отрыва продукта становится неравновесным и напряженным. Наконец, на заключительном этапе происходит медленная конформационная релаксация свободной молекулы фермента к исходному равновесному состоянию: $\tilde{E} \rightarrow E$.

Таким образом, конформационное изменение происходит в условиях существенной конформационной неравновесности. Координата реакции совпадает с координатой конформационной релаксации, которая протекает по определенным степеням и носит направленный характер: $E \rightarrow E^* \rightarrow \tilde{E} \rightarrow E$.

Именно наличие выделенных механических степеней свободы позволяет рассматривать смещения, происходящие в разных областях макромолекулы, как изменения, совершающиеся в один акт. Энергия, сосредоточенная на этих медленно релаксирующих степенях свободы, не диссипирует быстро в теплоту за счет размена по другим обычным степеням свободы, что используется фактически для обеспечения направленного характера релаксационных процессов в ферментативном катализе. С такой нетрадиционной точки зрения, теряет непосредственный смысл использование понятий энергии и энтропии активации, как это делают в теории активированного комплекса. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры определяется не числом активных молекул с энергией, достаточной для преодоления барьера, а влиянием температуры на конформацию макромолекулы и, следовательно, на путь и скорость ее последующей релаксации (см. § 2, гл. VII). Все молекулы субстрата, образовавшие «правильный» комплекс с ферментом, претерпевают химическое превращение в результате самопроизвольной релаксации фермента к новому конформационному состоянию. Конечно, с термодинамической точки зрения, общей движущей силой процесса является раз-

ность химических потенциалов субстрата и продукта. Однако она определяет лишь число встреч молекул фермента и субстрата, но не сам активационный механизм превращения фермент-субстратного комплекса.

Таковы в основном современные представления об общих механизмах ферментативного катализа. Для дальнейшего изложения необходимо сделать существенное замечание. Строго говоря, до сих пор здесь не использовали количественный анализ механизмов катализа, для чего необходимо, очевидно, построение конкретных физических моделей этого процесса. Ясно, что понимание механизмов требует детального изучения электронных взаимодействий в активном центре между функциональными группами. Эти взаимодействия осуществляются в целом на гораздо более коротких расстояниях по сравнению с невалентными атом-атомными взаимодействиями, определяющими характер внутримолекулярной динамики белковой глобулы фермента.

Кроме того, невалентные фермент-субстратные взаимодействия реализуются в системах, состоящих из многих сотен атомов, в то время как электронные, чисто химические взаимодействия происходят в активном центре между ограниченным числом атомов, принадлежащих функциональным группам. Невалентные взаимодействия приводят к конформационным изменениям, характерные времена которых намного больше, чем времена колебательной релаксации, сопровождающие чисто электронные переходы. На первом этапе катализа определяющее значение приобретает характер структурно-динамического взаимодействия фермент — субстрат. На втором этапе, после образования активного комплекса, основную роль уже играют квантово-механические электронные процессы взаимодействия между ограниченным числом атомных групп в активном центре. Следовательно, конформационно-динамические аспекты ферментативного катализа, связанные с формированием химически активной конфигурации, можно рассматривать независимо от квантово-механической природы элементарного акта разрыва связей субстрата в активном центре. Это обстоятельство отражает природу ферментативного акта как следствие электронно-конформационных взаимодействий в молекуле белка-фермента.

§ 3. Динамика фермент-субстратных взаимодействий

В теории активированного комплекса (XIV.1.1)—(XIV.1.3) рассматривается собственно химическая стадия реакции. Применение этих представлений для объяснения ферментативного катализа ограничено превращениями в уже «готовом» фермент-субстратном комплексе. Под величинами ΔS^\ddagger и ΔH^\ddagger здесь нужно понимать энтропию и энергию активации в уже образованной благоприятной конфигурации фермент — субстрат. Непосредственно динамика белка и ее роль в формировании благоприятной конфигурации здесь не учитываются.

Роль вязкости среды. Экспериментальные попытки исследовать этот аспект проблемы были предприняты в работах по изучению влияния вязкости среды на скорость ферментативной реакции. Так, например, изучали реакцию связывания CO и O₂ с миоглобином в различных растворителях (Г. Фрауенфельдер и др., 1980). Как оказалось, в широком диапазоне изменения вязкости растворителя константа скорости внутримолекулярной реакции связывания O₂ и CO в белке обратно пропорциональна значению вязкости системы белок — растворитель. Проникновение и диффузия низкомолекулярных лигандов (O₂, CO) в молекуле белка связаны с преодолением внутримолекулярных барьеров (см. гл. XI). В самом деле, увеличение вязкости растворителя уменьшает динамическую подвижность поверхностных групп белка,

что, в свою очередь, передается внутренним слоям и ограничивает также подвижность глубоко расположенных структурных элементов. Ограничения динамической подвижности препятствуют диффузии лигандов в белке и снижают общую скорость реакции.

Роль внутримолекулярной диффузии эквивалентна в данном случае фактору, влияющему на формирование фермент-субстратного комплекса (гем-СО): Модификация обычного уравнения активированного комплекса

(XIV.1.1) — (XIV.1.3) для учета влияния диффузии реагентов в химических процессах была предложена Крамерсом (1940). Его представления основаны на анализе процесса перехода броуновской частицы через потенциальный барьер в вязкой среде, описываемой управлением Фоккера — Планка (см. § 1, гл. XI). Значение константы скорости реакции зависит от вязкости растворителя как

$$k \approx \frac{A}{\eta} e^{-\Delta G/(RT)}, \quad (\text{XIV.3.1})$$

где A — константа, зависящая от структурных параметров системы. Эффективный профиль потенциального барьера реакции включает теперь несколько промежуточных максимумов, характеризующих барьеры при диффузии реагентов к месту химической реакции (рис. XIV.5). Применение теории Крамерса в анализе взаимодействия гем-СО дало следующее выражение для зависимости константы скорости реакции от вязкости и температуры:

$$k(T, \eta) = \left(\frac{A}{\eta} + A_0 \right) e^{-\Delta G/(RT)}, \quad (\text{XIV.3.2})$$

где член A соответствует остаточному процессу в условиях высокой вязкости, когда сохраняется лишь частичная внутренняя подвижность, показатель r варьирует в пределах $0 \leq r \leq 1$ в зависимости от вида белка; η соответствует вязкости растворителя и уменьшается экспоненциально с температурой как

$$\eta = \eta_0 e^{E_\eta/(k_B T)}, \quad (\text{XIV.3.3})$$

причем E_η — энергия активации вязкого течения — составляет $E_\eta \sim 3,5 k_B T$ для обычных водных растворов. Таким образом, в предложенной модели в неявной форме учитывается роль динамики белка в формировании активированного комплекса, на которое влияет вязкость растворителя.

Теоретические модели. В них учитывают стохастический характер формирования активной конфигурации фермент — субстрат при диффузии субстрата через белковую глобулу фермента.

В § 1, гл. XI была приведена модель ограниченной диффузии белковых фрагментов, совершавших микроконформационные движения с амплитудами 0,03—0,1 нм и временами корреляции $\tau_c \sim 10^{-7} \div 10^{-9}$ с. Эти движения соответствуют локальным движениям различных белковых групп типа заторможенного вращения, мягких деформаций и т. д. Однако описание более крупномасштабных изменений потребовало более конкретного учета реальной структуры белка. В связи с этим в модели учитываются движения жестких

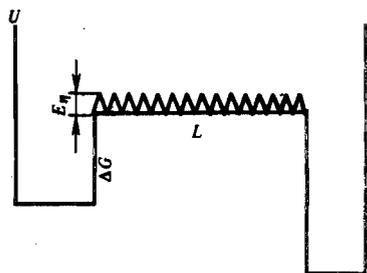


Рис. XIV.5.

Эффективный профиль потенциального барьера высотой ΔG (кДж/моль) и длиной L , включающий несколько промежуточных максимумов, характеризующих барьеры при диффузии:

E_η — энергия активации микроконформационных движений

α -спиральных участков и боковых групп, образующих «жидкоподобную опуху», демпфирующую изгибные движения α -спиралей (К. В. Шайтан). Иными словами, молекула белка здесь моделируется в виде жидкой капли, армированной упругими стержнями α -спирального каркаса. Аналогичный подход использовали ранее в теории флуктуаций ДНК (см. § 3, гл. IX).

Образование фермент-субстратного комплекса связано на первом этапе с проникновением или диффузией молекулы субстрата в щель на поверхности фермента, образованную относительно жесткими элементами структуры. После проникновения субстрата в щель на втором этапе происходит уже образование активной конфигурации за счет конформационных движений в комплексе. И лишь на третьем этапе после достижения определенной химически активной конфигурации происходит химическая реакция в системе субстрат — группы активного центра. В рамках одномодового приближения можно определить амплитуду прогиба α -спиралей вследствие тепловых флуктуаций под действием стохастической силы. Оказалось, что при длине участка α -спиралей $L \sim 5,0$ нм амплитуда флуктуаций щели составляет $A \sim 0,5$ нм ($T = 300$ К). При $\eta \sim 10$ Па·с время релаксации изгибных флуктуаций лежит в микросекундном диапазоне, что намного короче времени оборота фермента ($10^{-2} - 10^{-3}$ с).

Диффузия молекул субстрата в флуктуирующую щель на первом этапе фермент-субстратного взаимодействия возможна лишь при условии достаточного раскрытия ее на некоторую величину (r^*) (рис. XIV.6). При длине щели $L \sim 0,7 \div 2,5$ нм и значениях модуля Юнга $10^3 - 10^4$ Дж/см³ время релаксации щели $\tau \sim 10^{-6} \div 10^{-8}$ с. В модели оценивается характерное время диффузии субстрата в такую флуктуирующую щель. При значениях вязкости $\eta \sim 10$ Па·с, радиусе молекулы субстрата $\sim 0,2$ нм и глубине щели $l \sim 0,5$ нм это время составляет величину порядка 10^{-6} с.

Проникновение субстрата с «неподходящей» геометрией требует существенно большего раскрытия щели, чем в случае геометрического соответствия щели и молекулы субстрата. Следовательно, на стадиях образования комплекса фермент — субстрат структурное соответствие может задаваться размером и формой флуктуирующей щели. Однако в кинетическом отношении этапы проникновения субстрата в фермент не лимитируют общую скорость катализа.

Конформационная динамика белка. Особенности динамики непосредственно связаны с механизмом ферментативного катализа. Акт катализа происходит лишь при строго определенной ориентации нескольких групп, достигаемой за счет конформационных движений. Формально это соответствует одновременному соударению нескольких молекул, что в растворе крайне маловероятно. Однако в белке область конформационных движений отдельных групп снижается до нескольких кубических нанометров и реакции, практически не реализуемые в растворах, становятся здесь преобладающими и высокоселективными (рис. XIV.7).

На рис. XIV.8 приведено в качестве примера строение активного центра алкогольдегидрогеназы, цинкосодеждающего металлофермента, использующего в качестве кофермента НАД⁺. Ион Zn находится на дне гидрофобного «кармана», образованного в месте каталитического и связывающего нуклео-



Рис. XIV.6.
Диффузия субстрата S в флуктуирующую щель (объяснение см. в тексте)

тид доменов. Лигандами атома Zn являются атомы S аминокислотных остатков *цис-46* и *цис-174* и атом N остатка *гис-67*. Четвертый лиганд—молекула воды—связан с гидроксилом остатка *сер-48*, который, в свою очередь, образует водородную связь с *гис-51*.

В активном центре происходит окисление молекулы спирта до альдегида с переносом водорода на НАД⁺. Для осуществления этой реакции должен образоваться продуктивный тройной комплекс, включающий молекулы НАД⁺,

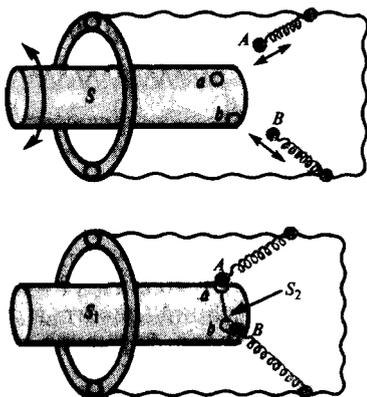


Рис. XIV.7.
Подстройка групп активного центра (A и B) и субстрата S с реакционноспособную конфигурацию.

Необходимым условием расщепления субстрата S на S₁ и S₂ является одновременный контакт групп A и a, B и b соответственно

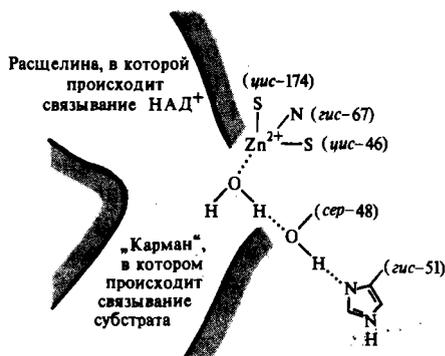


Рис. XIV.8.
Модель активного центра алкоголь-дегидрогеназы (по Ф. Фершту, 1980)

спирта и атом Zn (рис. XIV.9). Предполагают, что ионизированный спирт замещает связанную с Zn молекулу H₂O, причем атом O₂ спирта непосредственно присоединяется к иону Zn, а гидрофобная боковая цепь связывается с гидрофобной полостью «кармана».

В случае сериновых протеаз функциональные участки, осуществляющие сорбцию и нуклеофильный катализ (гидролиз) пептидной связи, пространственно разделены. По данным рентгеноструктурного анализа, в активном центре α-химотрипсина находится довольно вместительный гидрофобный «карман», где связывается ароматическая боковая группа гидролизуемого пептида и происходит фиксация субстрата (рис. XIV.10). Строение активного центра α-химотрипсина до взаимодействия с субстратом приведено на рис. XIV.11, где обозначены расстояния и углы вращения для остатков *асп-102*, *гис-57*, *сер-195*, участвующих в образовании активной конфигурации с субстратом.

На рис. XIV.12 показано взаимное расположение расщепляемой группы субстрата и боковых цепей *сер-195*, *гис-57*. Атом O^γ остатка *сер-195* находится на расстоянии 0,28 нм против карбонильного углерода C, а протон OH-группы, не нарушая водородной связи с атомом N^{ε2} *гис-57*, располагается на расстоянии 0,2 нм над атомом азота расщепляемой группы. Таким образом,

продуктивная конформация включает все необходимые функциональные группы, собранные в едином строго ориентированном ансамбле. Электронный характер их взаимодействия будет освещен в следующем параграфе, здесь необходимо отметить, что из всех возможных способов невалентного связывания субстрата в активном центре указанная взаимная ориентация расщепляемой связи и каталитически активных групп белка возникает лишь в одном случае. Именно тогда и только тогда происходит каталитический акт.

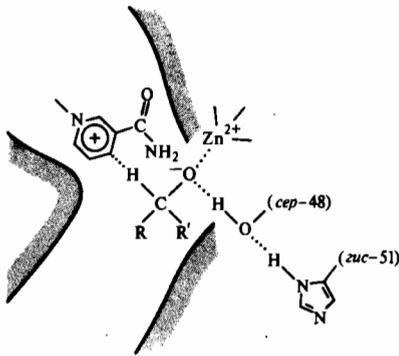


Рис. XIV.9.
Модель продуктивного тройного комплекса алкогольдегидрогеназы (по Ф. Фершту, 1980)

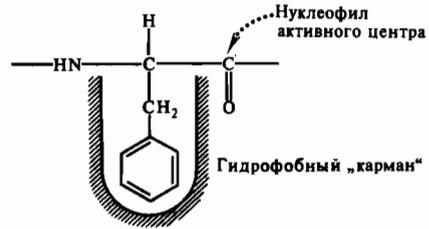


Рис. XIV.10.
Взаимодействие пептидного субстрата с сериновой протеазой (α -химотрипсин), активный центр которой состоит из пространственно разделенных сорбционного и каталитического участков (по И. В. Березину, К. Мартинку, 1977)

Модель формирования активной конфигурации. Пусть группы активного центра и субстрата характеризуются независимыми обобщенными конформационными координатами $(x_1, x_2, x_i, \dots, x_N)$, число которых N . Акт катализа будет совершаться со скоростью W , зависящей от оптимальных расстояний и ориентаций соответствующих групп $W(x_1, x_2, \dots, x_N)$. Исходя из общих представлений и принципа Франка — Кондона можно заключить, что реакционноспособное состояние в активном центре должно иметь конфигурацию, соответствующую пересечению электронных термов исходных реагентов и продуктов реакции (см. рис. XIII.8). Реакция происходит, когда координаты (x_i) приобретают «реакционные» значения (x_i^0) . При отклонении i -й конформационной координаты (x_i) некоторой активной группы от оптимального «реакционного» значения x_i^0 скорость реакции убывает как $e^{(-x_i - x_i^0)/a^2}$, где a ($\sim 0,005 \div 0,01$ нм) — амплитуда валентных колебаний вдоль соответствующей связи.

Будем упрощенно считать, что акт катализа идет с определенной скоростью W_0 , когда система, «блуждая» в N -мерном конфигурационном пространстве, попадает в «реакционную» a -окрестность оптимальной точки $(x_1^0, x_2^0, \dots, x_N^0)$, т. е.

$$W(\rho) = \begin{cases} W_0; & \rho \leq a; \\ 0; & \rho \geq a; \end{cases} \quad (\text{XIV.3.4})$$

где $\rho^2 = \sum_{i=1}^N (x_i - x_i^0)^2$ задает отклонение системы от оптимальной точки.

Таким образом, скорость ферментативного катализа определяется внутри-молекулярной динамикой фермент-субстратного комплекса. В качестве уравнения для описания этих стохастических движений можно воспользоваться либо уравнением Ланжевена (см. (XI.1.8)), либо эквивалентным ему уравнением Фоккера — Планка (см. (XIII.8.1)).

Химическая специфика процесса описывается членом $W(x_1, \dots, x_N)$, отражающим зависимость скорости превращения комплекса фермент — субстрат

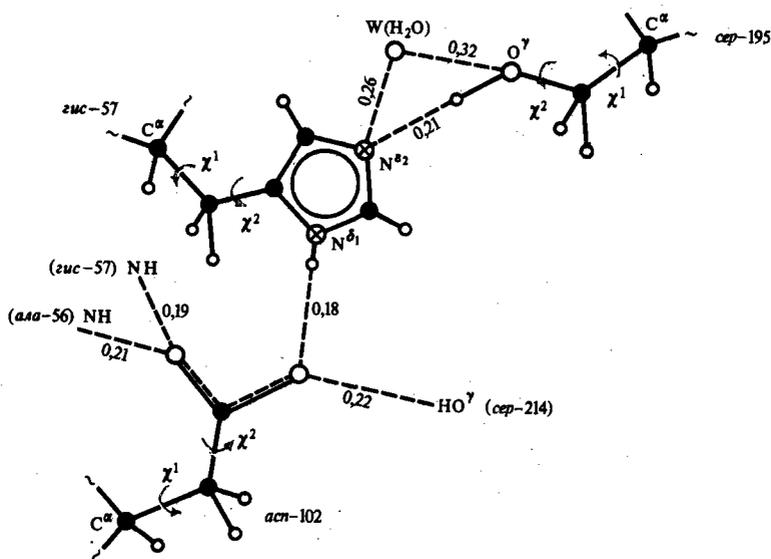


Рис. XIV.11.

Строение активного центра α -химотрипсина (цифрами показаны межатомные расстояния, нм)

в продукт от конформационных координат. Будем полагать, что скорость W_0 много больше скорости конформационной релаксации отдельных групп, т. е. среднее время химического акта $1/W_0$ в достигнутой активной конфигурации много меньше времени нахождения системы в «реакционной» области оптимальной точки ($\rho \leq a$). Тогда время распада комплекса фермент — субстрат и образования продукта не лимитируется химическим актом, а будет определяться именно средним временем образования активной конфигурации.

В этой модели (К. В. Шайтан, А. Б. Рубин) константа скорости ферментативной реакции определяется выражением

$$k_E \approx \frac{D}{\rho_0^2} N(N-2) \left(\frac{a}{\rho_0} \right)^{N-2} \quad \text{при} \quad \frac{W_0 a^2}{D} \ll 1, \quad (\text{XIV.3.5})$$

где $N \geq 3$ — общее число степеней свободы активных групп, которое может быть определено из химического механизма реакции. Так, например, при гидролизе пептидной связи необходима благоприятная ориентация для двух групп активного центра относительно определенных участков субстрата. Вклад каждой группы в N равен трем, а с учетом либраций молекулы субстрата общее число степеней свободы $N \sim 6 \div 7$. Согласно данным мессбауэровской спектроскопии (см. § 2, гл. X), амплитуда локальных конформационных дви-

жений белковых групп при комнатной температуре $\rho_0 \sim 0,1$ нм, а значение коэффициента диффузии $D \sim 10^{-9}$ см²·с⁻¹. Следовательно, $D/\rho_0^2 \sim 10^7$ с⁻¹ и

$$k_E \approx 10^7 N(N-2) \left(\frac{a}{\rho_0} \right)^{N-2},$$

или $k_E \sim 10^2 \div 10^4$ с⁻¹, что совпадает с обратными временами оборота фермента в условиях субстратного насыщения.

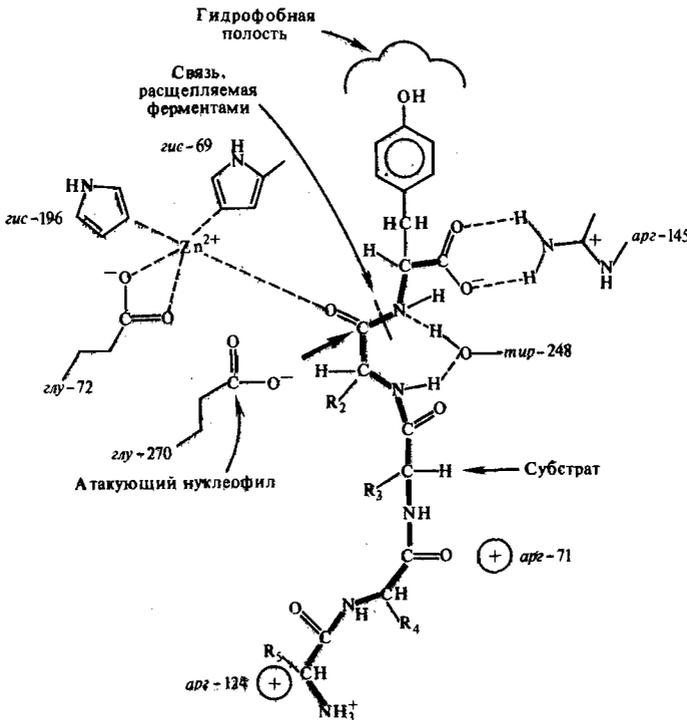


Рис. XIV.12.

Пример образования активной конфигурации или цепи перераспределения связей в случае гидролиза пептидной связи карбоксидазой А

В растворе для аналогичной реакции эффективная величина ρ_0 намного больше и составляет не менее $\rho_0 \sim 10$ нм. Отсюда видно, что даже при больших коэффициентах диффузии $D \sim 10^{-5} \div 10^{-6}$ см²·с⁻¹ скорость ферментативной реакции за счет определенной и достаточно жесткой структурно-динамической организации активного центра как минимум на пять порядков превосходит скорость аналогичной реакции в растворе. В формуле (XIV.3.5) температурная зависимость k_E определяется зависимостью $D(T) \sim e^{-\epsilon/(k_B T)}$, где ϵ — энергия активации диффузии по конформационным подсостояниям. Согласно данным мессбауэровской спектроскопии, $\epsilon \sim 21 \div 63$ кДж/моль для разных белков. Если в активной области существует локальный барьер высотой ΔE , предшествующий движениям групп, то эффективная энергия активации для k_E будет большей и составит $\epsilon + \Delta E$.

Формула (XIV.3.5) показывает, что скорость ферментативной реакции зависит от коэффициента конформационной диффузии D (или микровязкости белка) и амплитуды конформационных движений групп активного центра

(ρ_0). Именно эти факторы определяют время образования продуктивной конфигурации. Увеличение размерности конфигурационного пространства N , зависящего от числа функциональных групп и необходимых одновременных контактов между ними, должно, конечно, приводить к замедлению этого процесса. Однако высокая скорость и направленный характер химических превращений в образованных многоцентровых активных конфигурациях не лимитируют общую скорость катализа. Таким образом, общая скорость ферментативного катализа определяется характерным временем образования нужной конформации в активном центре при естественном сближении соответствующих групп за счет внутримолекулярной динамики. Это время сравнимо по порядку величины с временами оборота фермента. Можно считать, что в рамках сделанных допущений приведенная модель описывает процесс конформационной релаксации в фермент-субстратном комплексе, ведущий к образованию продуктов реакции (см. § 2, гл. XIV).

§ 4. Электронные взаимодействия в активном центре фермента

Условием успешного совершения каталитического акта является образование активной конфигурации, где функциональные группы нужным образом сближены и взаимно ориентированы. Конечно, механизм и результат их взаимодействия зависят от деталей их молекулярной структуры и должны рассматриваться специально в каждом конкретном случае с позиций квантовой химии. Пока существует сравнительно мало примеров такого рода, однако можно уже сейчас указать на ряд специфических особенностей фрагментов, облегчающих превращения субстрата в активном центре.

Микросвязи активного центра. Сорбция субстрата приводит к переводу его молекулы из водной среды в окружение аминокислотных остатков в активном центре. Как правило, микросреда активного центра обладает более низкой диэлектрической проницаемостью по сравнению с водой. Так, значение диэлектрической проницаемости в сорбционном участке активного центра химотрипсина $\epsilon < 10$ (для белка обычно принимают $\epsilon \sim 3$, для воды $\epsilon = 80$). Причина этого связана с фиксированной ориентацией диполей белка по отношению к заряженным группам субстрата. В этом состоит отличие их от «свободных» диполей воды, которые ослабляют кулоновские взаимодействия зарядов при переориентации. В результате происходит усиление электростатических взаимодействий (см. (VIII.2.1)) в гидрофобной среде между реагентами и полярными группами фермента. Кроме того, микросреда активного центра обладает сильно пониженной полярностью по сравнению с водой, особенно в тех местах глобулы, где происходят гидрофобные взаимодействия аполярных аминокислотных остатков полипептидной цепи. В случае реакций, сопровождающихся переносом заряда в активном центре, а таких, как правило, большинство, малополярная белковая среда подвергается сравнительно небольшой реорганизации и частично экранирует переносимый заряд от действия полярного растворителя.

Рассмотрим более подробно роль этого фактора в ферментативных реакциях с переносом заряда (Л. И. Кришталик). Согласно формуле (XIII.5.19), энергия активации реакции, сопровождающейся переносом заряда и реорганизацией окружающей среды, выражается как

$$E_a = (E_r - \Delta E)^2 / (4E_r), \quad (\text{XIV.4.1})$$

где ΔE — тепловой эффект реакции; E_r — энергия реорганизации среды

(см. (XIII.5.16)). В данном случае E_r — энергия переориентации диполей из начальной в конечную конфигурацию, которая определяется при условии, что система остается на начальной электронной терме, т. е. заряд не переносится. Малая подвижность диполей белка означает, что они вносят не большой вклад в энергию реорганизации по сравнению с дипольным окружением в растворе, тем самым снижая значение E_r в ферменте. При этом снижается и энергия активации в (XIV.4.1). Фактически в белковой глобуле исключается часть объема растворителя, обладающего большей энергией реорганизации из сферы взаимодействия с зарядом реагирующих частиц. Очевидно, этот эффект проявляется в большей степени при увеличении объема глобулы, но до определенного предела, зависящего от расстояний между взаимодействующими зарядами. Расчеты были проведены для случая переноса заряда между двумя точками, расположенными на радиусе сферы, обладающей диэлектрической проницаемостью много меньшей, чем ϵ окружающего растворителя. Оказалось, что при радиусе сферы до 1,5 нм включение в нее реагентов приводит к снижению энергии реорганизации среды на 42—84 кДж и к соответствующему ускорению реакции.

Другим важным фактором, влияющим на величину E_a активационного барьера, является образование локальных электрических полей за счет высоких локальных концентраций диполей пептидных связей. В таких заряженных участках электростатический потенциал может достигать нескольких десятков милливольт, что при обычных размерах активного центра (0,5—1,0 нм) приводит к напряженности поля порядка тысяч и сотен тысяч единиц (В/см).

Таким образом, ориентированные полярные группы создают внутриглобулярное электрическое поле, в котором происходит перенос заряда. Наряду с сильным снижением диэлектрической проницаемости этот фактор также влияет на величину кулоновского взаимодействия зарядов, или на разность энергий начального и конечного состояний заряженных частиц, т. е. на величину теплового эффекта ΔE элементарного акта переноса заряда. Это, в свою очередь, сказывается на энергии активации всего процесса и может приводить к его ускорению для определенного класса реакций. Это справедливо, в частности, для тех реакций, в ходе которых уменьшается абсолютная величина заряда каждой из реагирующих частиц или одной из них, расположенной дальше от границы раздела белковая глобула — водная среда.

Общий характер влияния электронно-конформационных взаимодействий на энергию активации элементарного акта можно представить на основе схемы изменения электронных термов (рис. XIV.13). Упрощенно будем рассматривать электрон внутри потенциального ящика с параболическими стенками, считая, что он производит давление на стенки ящика. Если в исходном состоянии электрон переходит на другой, более высокий, уровень, то соответственно должна расширяться параболическая кривая потенциальной энергии взаимодействия за счет увеличенного давления электрона на стенки ящика при повышении его энергии. В том случае, когда координата реакции совпадает с соответствующей ядерной координатой, это приведет к падению

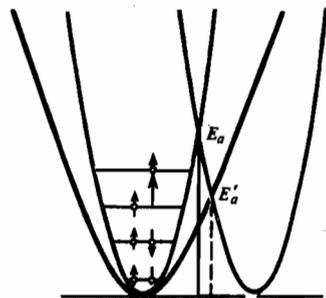


Рис. XIV.13.

Модель электронно-конформационных взаимодействий за счет положения активационного барьера реакции при возбуждении электрона в исходном состоянии (по М. В. Волькенштейну, 1981)

энергии активации в результате перемещения точки пересечения термов, как это показано на рис. XIV.13 (пунктирная кривая).

Электронные переходы. Индуцированные в результате взаимодействия молекулярных орбиталей реагентов, сближенных в активной конфигурации, электронные переходы играют триггерную роль в элементарном акте катализа. Для количественного решения этой проблемы требуется привлечение методов квантовой химии и, в частности, метода межмолекулярных орбиталей (ММО). Идея метода ММО состоит в том, что молекулярная орбиталь комплекса может быть представлена линейной комбинацией МО, составляющих комплекс (ср. с методом ЛКАО; § 1, гл. XII). Под влиянием возмущения, обусловленного взаимодействием электронов и ядер, будут смешиваться МО основного и возбужденного состояний каждой молекулы. Главную роль будут играть взаимодействия МО, расположенных близко по энергии к граничным орбиталам: верхней (разрыхляющая) занятой и нижней (связывающая) свободной. Энергия взаимодействия граничных орбиталей зависит от степени перекрытия верхней занятой и нижней свободной, что определяется видом орбиталей при взаимной ориентации молекул. В результате такого перекрытия изменяется распределение электронной плотности в молекулах, а это, в свою очередь, меняет их характеристики и, главное, прочность связей. Если электронная плотность добавляется на разрыхляющие орбитали и уменьшается на связывающих орбиталях, то это приводит к ослаблению соответствующих связей.

Такого рода эффекты возможны при взаимодействии МО активных групп фермента с МО атомов атакуемой связи в субстрате. Появление дополнительной электронной плотности на разрыхляющей орбитали в какой-то степени равносильно образованию возбужденного состояния этой молекулы. Во многих случаях дипольные моменты молекул в возбужденном и основном состояниях сильно различаются, так же как и значения pK . Ясно, что эти факторы играют дополнительную роль, обеспечивая специфические условия в микросреде активного центра, благоприятной для акта катализа.

Рассмотрим характер взаимодействий продуктивной конфигурации в активном центре α -химотрипсина (рис. XIV.14). Эти реакции проходят по механизму нуклеофильного замещения. Нуклеофильный агент (основание) *ser*-195 приближается к атому углерода с дефицитом электронов (электрофильный центр C' в пептидной связи) и образует с ним связь, замещая при этом атом N. Замещаемый атом N с неподеленной парой электронов уходит вместе с примодиненным к нему протоном. Таким образом, в основе реакции лежит разрыв пептидной связи субстрата, приводящий к ацилированию фермента. Этот процесс проходит через тетраэдрическое промежуточное состояние с образованием валентной связи $O'—C'$ между ферментом и субстратом.

На рис. XIV.14 представлены два предельных случая, которые могут предшествовать реакции разрыва связи $N—C$ и ацилирования фермента. В одном случае (рис. XIV.14, I) нейтральная боковая цепь *ser*-195 занимает положение, необходимое для нуклеофильной атаки на атом C' гидролизуемой связи. В другом случае (рис. XIV.14, II) предполагается, что протон уже перешел от гидроксила *ser*-195 к азоту N^{e2} имидазольного кольца *his*-57, так что атомы C' и N пептидной связи подвергаются атаке алколят-ионом $O'_{(195)}$ и группой $N^{e2}H$. Стадия депротонирования $O'_{(195)}$ облегчает разрыв пептидной связи, так как ион кислорода — более сильный нуклеофильный агент, чем нейтральный атом.

Рассмотрим характер связи между отдельными этапами взаимодействия атомов в тетраэдрическом комплексе. Переход протона между *ser*-195 и *his*-57 облегчается тем, что связь $O'_{(195)}—H$ ослабляется при взаимодействии

между $O_{(195)}^{\gamma}$ и C' . Здесь происходит стекание электронной плотности на разрыхляющие орбитали в пептидной связи за счет взаимодействия неподеленной пары электронов O^{γ} с π -электронами атома C' , изменения гибридизации атомов C' и N ($sp^2 \rightarrow sp^3$) и, как следствие, ослабления связи $N=C'$ (см. § 1, гл IX; рис. IX.2).

Таким образом, одновременно с ослаблением связи $O^{\gamma}-H$ облегчаются атака $O_{(195)}^{\gamma}$ на углерод C' , выталкивание неподеленной пары электронов

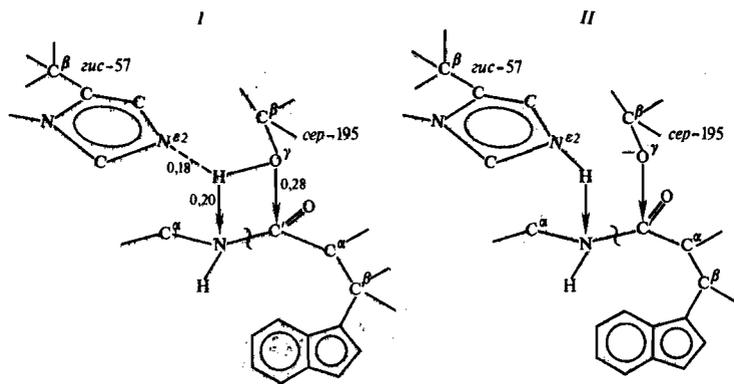


Рис. XIV.14.

Расположение расщепляемой группы субстрата и боковых цепей *serp-195* и *guc-57* в невалентном комплексе α -химотрипсина (по Е. М. Попову, 1977):

I — без перехода протона по *serp-195* к *guc-57*; *II* — с переходом протона от *serp-195* к атому $N^{\epsilon 2}$ имидазольной группы *guc-57*; цифрами обозначены равновесные межатомные расстояния (нм) в невалентном фермент-субстратном комплексе

азота аминной группы из пептидной связи $N=C'$ и ее разрушение. Следствием этого является повышение основности аминной группы, что облегчает ее протонирование ферментом. Протон при этом переходит от $O_{(195)}^{\gamma}$ к *guc-57*, что также ослабляет связь $N=C'$. Это способствует повышению эффективности взаимодействия $O_{(195)}^{\gamma}$ и C' и т. д. Таким образом, в тетраэдрическом комплексе создается совершенно уникальная ситуация, когда несколько реакций протекают одновременно, взаимно ускоряя друг друга. Комплекс представляет собой зарядно-релейную систему переноса заряда, где происходит синхронное перемещение заряда и протона между тремя атомными группами (*serp-195*, *guc-57*, пептидная связь).

Понятно, что в растворе одновременная встреча трех свободных групп маловероятна, а их попарное «беспорядочное» взаимодействие будет малоэффективным. Каталитический акт сводит в единую кооперативную систему три отдельные бимолекулярные реакции, где осуществляются многоточечные взаимодействия между ее компонентами. Перекрытие электронных орбиталей этих реагентов приводит к взаимосвязанному перераспределению электронной плотности между ними и, как следствие, разрыву связи. Изменение зарядов ведет к естественным конформационным перестройкам и в итоге к выходу продуктов гидролиза из фермент-субстратного комплекса и регенерации фермента. При этом создается новая зарядно-релейная система, где происходит деацилирование фермента и протонирование атома $O_{(195)}^{\gamma}$, а роль гидроксильной группы *serp-195* играет молекула воды.

Аналогичным образом происходит гидролиз эфирных связей, $\text{CH}_3\text{—CO—O}$, где триггерным механизмом является стекание отрицательной электронной плотности неподеленной пары $\text{O}(\text{I}_{95})$ на разрыхляющую p_z -орбиталь атома углерода эфирной связи. Эффективность электронных взаимодействий определяется электронной емкостью разрыхляющих орбиталей и, разумеется, степенью перекрывания орбиталей атомных групп в фермент-субстратном комплексе.

Принцип образования полифункциональной замкнутой системы атомных групп в активной конфигурации выполняется и в случаях других фермент-субстратных комплексов.

В качестве еще одного примера расчета электронных свойств фермент-субстратных комплексов рассмотрим схему взаимодействия между глутамат-декарбоксилазой и глутаминовой кислотой, приведенную на рис. XIV.15. В результате нуклеофильной атаки атома (C8) аминогруппой глутаминовой кислоты исходный комплекс кофермента с лизином (I) преобразуется в нестабильный промежуточный тетраэдрический комплекс (II). Затем происходит разрыв связи между атомом C^α и азотом аминогруппы лизина с образованием «внешнего» шиффа основания аминокислоты с коферментом (III). Следующая стадия ферментативной реакции — отщепление карбоксильной группы с образованием карбаниона (IV). Она одна из самых важных и существенных не только в декарбоксилировании, но вообще в реакциях пиридоксалевого катализа. На этом этапе разрывается связь между атомом C^α и соседним с ним атомом одного из заместителей (H, COO^- , R), что, собственно, и определяет специфичность дальнейших превращений аминокислот. Различие между этими превращениями заключается в том, с каким из заместителей при атоме C^α разрывается ковалентная связь. Взаимодействие сопряженной π -электронной системы с электронами связей, исходящих из атома C^α , ослабляет ту из этих связей, которая располагается в плоскости, перпендикулярной плоскости пиридинового кольца.

Квантово-химические расчеты были выполнены в π -электронном приближении без учета в явном виде σ -электронов с помощью варьирования числовых значений специально выбранной системы параметров (Ф. Савин). Действительно, оказалось, что при повороте группы $\text{C}^\alpha\text{HPCOOH}$ относительно ординарной связи $\text{C}^\alpha\text{—N}$ шиффа основания III прочность связей $\text{C}'_\alpha\text{—x}$ (где $x\text{—H, R, COO}^-$) меняется. Она зависит от угла поворота φ . Максимальная величина ослабления связи $\text{C}^\alpha\text{—COO}^-$ достигается тогда когда эта связь располагается в плоскости, перпендикулярной плоскости молекулы, причем в этой конформации полная энергия молекулы не намного превышает (13—34 кДж/моль) ее минимальное значение. После соответствующей ориентации связи $\text{C}^\alpha\text{—COO}^-$ относительно плоскости молекулы происходит ее разрыв, в результате которого выделяется CO_2 и образуется молекула карбаниона (IV). Затем протон присоединяется к атому C^α или C8 с образованием соответственно шиффа основания с γ -аминомасляной кислотой либо кетимина (продукты V). На последующих стадиях реакции все преобразования или происходят в обратном порядке через тетраэдрический комплекс VI или осуществляется гидролиз связи $\text{C}=\text{N}$ продукта V.

Особенность общей картины стабилизации или ослабления различных связей молекулы IV при вращении группы $\text{C}^\alpha\text{HPCOO}^-$ относительно связи $\text{C}^\alpha\text{—N}$ состоит в том, что при таком вращении происходит одновременно изменение прочности не одной, а многих связей этой молекулы. В частности, возможно дестабилизирующее влияние на связь $\text{C}^\alpha\text{—COO}^-$ других заряженных групп фермента, например отрицательно заряженной фосфатной группы кофермента. Как видно, в продуктивной конфигурации при пиридоксальевом

катализе достигается вполне определенное взаимное расположение одновременно нескольких функциональных групп, способствующее лабильности именно тех связей, которые должны быть разорваны в ходе соответствующей ферментативной реакции.

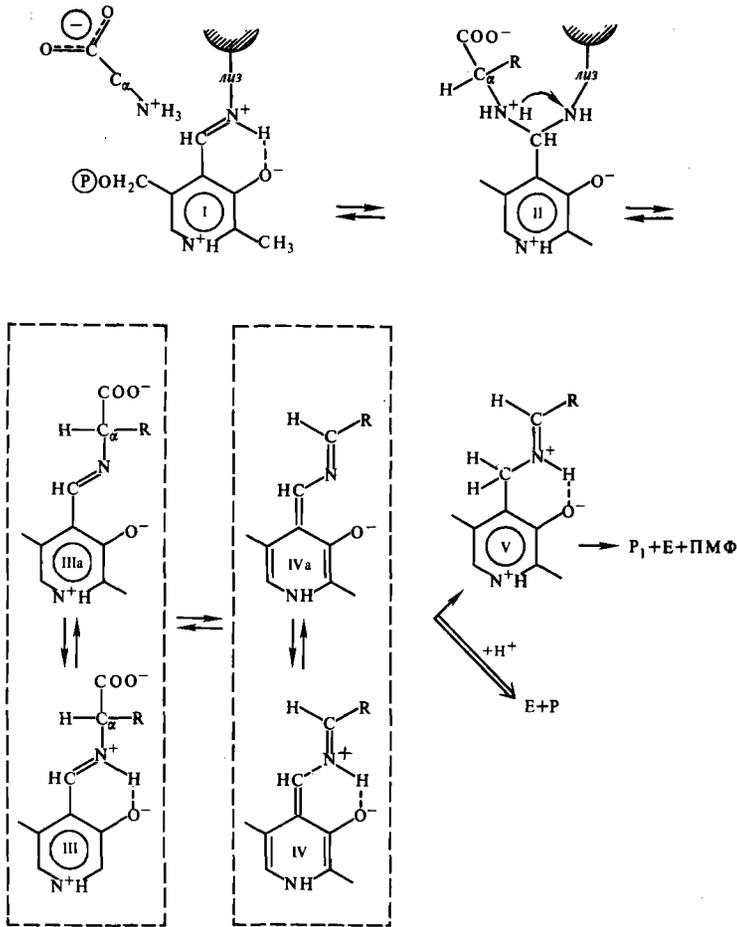


Рис. XIV.15.

Модель механизма взаимодействия между глутаматдекарбоксилазой и глутаминовой кислотой (объяснение см. в тексте):

ПМФ — пиридоксальмонофосфат

Из этих примеров следует, что в ферментативном катализе многостадийный характер превращений субстрата обеспечивается за счет синхронного кооперативного их протекания в единой полифункциональной системе. Именно это и приводит к требуемому с формальной кинетической позиции снижению энергии активации всего процесса. Вместо малоэффективного осуществления последовательных активационных стадий здесь происходит скоординиро-

ванное превращение субстрата в состоянии, фактически эквивалентном по своим свойствам переходному состоянию, уже готового активированного комплекса.

Приведенный в настоящей главе материал показывает, что еще далеко до создания точной количественной теории ферментативного катализа, которая бы имела общий характер. Очевидно, необходимым этапом в построении такой теории должно быть раскрытие конкретных механизмов и роли электронно-конформационных взаимодействий на последовательных стадиях: проникновение субстрата в активный центр фермента, формирование в нем активной конфигурации, электронные взаимодействия между функциональными группами фермента и субстрата и, наконец, образование и выход продукта.

Рекомендуемая литература

К разделу I

- Жаботинский А. М.* Концентрационные автоколебания. М., 1974.
Иваницкий Г. Р., Крицкий В. И., Сельков Е. Е. Математическая биофизика клетки. М., 1978.
Марри Дж. Нелинейные дифференциальные уравнения в биологии. М., 1983.
Романовский Ю. М., Степанова Н. В., Чернавский Д. С. Математическая биофизика. М., 1984.
Рубин А. Б., Пытьева Н. Ф., Ризниченко Г. Ю. Кинетика биологических процессов. М., 1987.
Эберлинг В. Образование структур при необратимых процессах. М., 1979.
Эйген М., Шустер П. Гиперцикл. М., 1982.

К разделу II

- Николис Г., Пригожин И.* Самоорганизация в неравновесных системах. М., 1979.
Пригожин И. От возникающего к существующему. М., 1985.
Романовский Ю. М., Степанова Н. В., Чернавский Д. С. Математическая биофизика. М., 1984.
Рубин А. Б. Термодинамика биологических процессов. М., 1984.
Хакен Г. Синергетика. М., 1980.

К разделу III

- Бирштейн Т. М., Птицын О. Б.* Конформация молекул. М., 1963.
Волькенштейн М. В. Биофизика. М., 1981.
Де Жен П. Идеи скейлинга в физике полимеров. М., 1982.
Хохлов А. Р. Статистическая физика макромолекул. М., 1985.
Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков. М., 1982.

К разделу IV

- Блюменфельд Л. А.* Проблемы биологической физики. М., 1977.
Де Жен П. Идеи скейлинга в физике полимеров. М., 1982.
Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия. М., 1984.
Френкель Я. И. Кинетическая теория жидкостей. Л., 1975.

К разделу V

- Агранович В. М., Галанин М. Д.* Перенос энергии электронного возбуждения в конденсированных средах. М., 1978.
Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения/В. Л. Ермолаев, Е. И. Борунов, Е. В. Свешникова, Т. А. Шахвердов. Л., 1977.
Березин И. В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. М., 1977.
Волькенштейн М. В. Биофизика. М., 1981.
Ладик Я. Квантовая биохимия для химиков и биологов. М., 1975.
Маррел Дж., Кеттл С., Теддер Дж. Теория валентности. М., 1968.
Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. М., 1980.
Чернавская И. М., Чернавский Д. С. Туннельный транспорт электронов в фотосинтезе. М., 1977.

Предметный указатель¹

- Автоволновые процессы 48, 54
Автоколебания 36*, 40, 48, 52*, 64, 65, 67, 68*
- Активный центр фермента 304*, 306
- Базовая модель** 54
- Белки, гидратация** 175
- денатурация температурная 127
 - динамика 186
 - конформационная динамика 186, 189—193, 221, 301
 - неравновесные конформационные состояния 190
 - особенности структуры 147
 - проводимость 271, 273
 - пространственная организация 151, 187*
 - самоорганизация 154, 155
 - связь первичной, вторичной и третичной структур 151
 - структурные изменения 186
 - уникальность структуры 159
 - фазовые переходы 127
 - физические модели динамической подвижности 221, 227, 228, 230
- Биополимеры, гибкость** 121
- глобула 123, 124, 125*, 126
 - клубок 123, 124, 125*, 126
 - оптическая активность 250
 - пространственная организация 117, 144
 - свободно-сочлененная цепь 119, 120*
 - статистический характер организации 119
 - электронные свойства 236
- Биофизика молекулярная** 117
- предмет 6
 - сложных систем 11
- Бифуркационная диаграмма** 19*
- Бифуркационные значения параметра** 19, 20
- Брюсселятор** 51, 52*, 54
- Вероятности перехода** 73
- Вероятностные модели** 69
- переходы в мультиферментных комплексах 74
- Взаимодействия Ван-дер-Ваальса** 130
- — типы 131
 - заряд-дипольные 135
 - электронов и ядер (анизотропное и изотропное) 203
 - электростатические 137
- Вода, гидрофобные взаимодействия** 171, 173
- неоднородность распределения молекул 174
 - строение 169, 171*
 - типы состояния 170, 171*
 - жидкая 169, 170*
- Водородные связи** 135, 136*, 152, 174
- Вращение внутреннее** 137
- — энергия 137
- Вырожденная система уравнений** 42, 44*
- Гетерополимеры** 127
- Гидратация белка** 175
- энергетические эффекты 176
- Гиперхромизм** 247
- Гипохромизм** 246
- Гистерезис** 53*, 62*, 65
- Гликолиз, модель** 38*, 39*
- Гомополимер** 123, 127
- Гошконформации (свертки)** 140
- Денатурация белков** 129, 183
- Динамическое поведение биологических систем, типы** 32
- Дисперсия оптического вращения** 250
- Диссипативная структура** 50, 54
- ДНК, конформационный анализ** 165, 166, 168*
- модель гибкого стержня 163
 - — спираль — клубок 164
 - физические модели 161, 168*
 - экзоконформация 165
 - эндоконформация 165
- Закон Гесса** 83
- действующих масс 72
- Иерархия времен в биологических системах** 40
- Изоклины** 24, 33*, 38*, 42*, 43, 67*
- Изомерия поворотная** 137, 140

¹ Звездочкой отмечены страницы, на которых помещены рисунки или таблицы.

- Ингибирование ферментативных реакций 57, 60*, 61*, 62*, 65
- Интеграл кулоновский 244
— резонансный 244
- Информационная емкость 116
- Информация биологическая 109, 112
— — количество 113
— — ценность 114, 161
— возникновение 115, 116
— запоминание и хранение 115, 116
— избыточная 114
— негэнтропийный принцип 113
— неизбыточная 114
— рецепция 115
— связь с энтропией 113
- Катализ, электронные переходы 159**
- Каталитический акт 309
- Квантово-механические представления об электронном строении молекул 236
- Квантово-механический эффект ориентации связей 139
- Квантовые уровни энергии 238
— числа 238
- Кинетика ферментативных процессов 55
- Клубок — глобула, переходы 126, 127
- Колебания в ферментативных системах 64
- Колебательные процессы в биологии 36
- Конверсия интеркомбинационная 196
- Константа Михаэлиса 56
— электронно-колебательной связи 267
- Конформационная подвижность и трансформация энергии 278
- Кооперативная система 138
- Кооперативность 77
- Корреляционная функция, временной характер затухания 231
- Коэффициент избирательности мембраны 92
— конформационной диффузии 221
- Коэффициенты вириальные 125
— Онзагера 91, 92
- Критерии эволюции термодинамические 102.
- Критерий Ляпунова 18, 24*
— направленности превращений в изолированной системе 83
- Круговой дихроизм 250, 252*
- Люминесценция 194**
- Макроинформация 116**
- Макромолекулы, типы взаимодействий 130
- Мембранный перенос 62, 63*
- Метка, частота вращения 205
- Метод валентных связей 239
— динамического моделирования 230
— изоклин 23
— изотопного обмена 192
— квазистационарных концентраций 40, 41
— кристаллических орбиталей 249
— линейных комбинаций атомных орбиталей 240, 243
— редукции систем дифференциальных уравнений 40, 41
— рентгенодинамического анализа 218
— спиновых меток 199, 203
— спин-эха 211
— ядерного магнитного резонанса 206, 208
— ЯМР импульсный 210
- Методы гамма-резонансной спектроскопии 212, 225, 227**
— изучения внутримолекулярной подвижности 192, 194, 197, 199, 206, 212, 218
— исследования динамических моделей 11—14
— — конформационной подвижности белков 192
— качественной теории дифференциальных уравнений 14, 21, 22
— конформационного анализа 153, 158
- Миграция электронного возбуждения, механизмы 283**
— — — — индуктивно-резонансный 283, 284
— — — — обменно-резонансный 283, 286, 287
— — — — экситонный 283, 288
— энергии в биоструктурах 255
- Микроинформация 115**
- Моды акцептирующие 267, 275**
— мягкие 271
— неустойчивые 50
- Модели базовые 48**
— взаимодействия стохастические 69
— детерминированные 69
— математические общие 13
— — простейшие 17, 21
— состояния воды 169*, 170
— ферментативных процессов биофизические 291—296
- Моделирование динамики белка 221, 223, 230**
- Модель «белок-машина» 294, 295***
— Вольтерра 21, 22, 54
— генетического триггера 34
— дискретных состояний и фазовых переходов 228
— «дыба» 294
— ограниченной диффузии 221
— упругой деформации белка 296
— химической реакции 27
— хищник — жертва 28, 29*, 30*

- Неустойчивость колебательного типа 52
 — Тьюринга 52
 Нуклеиновые кислоты, особенности пространственной организации 161, 168*
 Оператор Гамильтона 238
 Орбитали электронные 188*, 194, 238, 239*, 241*, 249*
 Особая точка 15, 17, 18*, 23, 24, 27
 — — бифуркация 28, 31, 40, 44*, 52, 107
 — — седло 26*, 27, 32, 33*, 34, 35, 52, 106*, 107
 — — узел 26, 31, 35
 — — — неустойчивый 26*, 106*
 — — — устойчивый 26*, 96, 104, 105, 107*
 — — — фокус 26*, 27, 31, 40, 103
 — — — неустойчивый 107
 — — — устойчивый 106*
 — — центр 27*, 29*, 31, 37, 103, 106*
 Осциллятор броуновский с сильным затуханием 221
 Пептидная группа 245
 — связь 144, 146*
 Переходы в двухуровневой системе 257, 262, 283
 — электронные 242
 Потенциал Букингема 134, 149
 — внутреннего вращения 139
 — кинетический 103, 109*
 — конформационный 221, 278
 — Леннарда — Джонса 135, 166
 — скоростей 103
 — термодинамический 83
 Потенциалы взаимодействия 130, 134
 Правила Хунда (заполнение орбиталей электронами) 187
 Предельный цикл 36*, 38*, 40, 52*, 68
 Принцип Паули 241
 — суперпозиции состояний 243, 258
 — Франка — Кондона 195, 266
 Процессы марковские 73, 77
 — неравновесные (необратимые) 82
 — равновесные (обратимые) 82
 Работа полезная максимальная 83
 Равновесие неустойчивое 17
 — устойчивое 17
 Реакция Белоусова — Жаботинского 54
 Релаксация в системе спинов 200
 — спин-решеточная 177*, 200, 201, 209*
 — спин-спиновая 177*, 201, 202, 209*, 211
 Самоорганизация, процессы 45, 48, 50
 Сверхтонкая структура в спектрах ЯМР 208
 Синергетика 50
 Смещение среднеквадратичное 224
 Соотношение неопределенностей Гейзенберга 132, 133
 Соотношения Онзагера 81, 90, 91, 98
 Спин-спиновый обмен, физические механизмы 202
 Спираль — клубок, переход 178, 179, 181*
 Стационарная точка. См. Особая точка
 Стационарные состояния, критерии устойчивости 100, 101, 104, 105, 109
 Θ-Температура 124
 Теплоемкость белка, связь со структурными изменениями 128
 Теорема Пригожина 94, 110
 — Тихонова 43, 44
 Теория «катастроф» 20*
 — переходного состояния (активированного комплекса) 291
 — поворотного-изомерного строения 140
 — роста термодинамическая 96, 97
 Термодинамика, второй закон 80, 82, 83
 — — — в открытых системах 85
 — линейная 82
 — метаболических циклов 98
 — нелинейная 81, 100, 101, 105
 — первый закон 80, 82
 — ферментативного катализа 291
 Термодинамические параметры 82
 Термодинамическое сопряжение процессов 88, 89
 Точечные системы 15
 Транспорт активный 92
 — пассивный 92
 — электрона 254—256
 — — — туннельный 255, 257, 259, 261*, 263, 264
 — — — по белковой цепи 271
 Триггерные свойства ферментных систем 60, 62, 68
 Триггеры биологические 32, 33*
 Туннелирование, скорость 267
 Упорядоченность биологическая 109
 Уравнение Гинзбурга — Ландау 50, 54
 — диффузии 45
 — Ланжевена 223, 232, 276, 304
 — линеаризованное 18, 25
 — Михаэлиса — Ментен 55
 — системы характеристическое 25
 — Фоккера — Планка 276
 — Шредингера 237, 238, 258, 259, 264
 Уравнения Колмогорова 73

- Оизагера 94
- Устойчивость биологической организации 111
- стационарного состояния 24, 25, 47
- Фазовая плоскость** 22
- траектория 15, 22
- Фазовое пространство 15
- Фазовые переходы, роль выделенных степеней свободы 181
- Фермент, число оборотов 55
- Ферментативные реакции простейшие 55
- Ферментативный катализ 291
- — модели 293, 297
- — термодинамика 291
- — электронно-конформационные взаимодействия 297—299
- Фермент-субстратные взаимодействия 58*, 60*, 299
- — теоретические модели 300
- Флуоресценция, квантовый выход 197
- Формула Гамова 261
- Дебая — Валлера (Лэмба — Мёссбауэра) 215, 226
- Ока 142
- Функция корреляции 224, 233*
- Химическая связь, природа** 241
- Хромофоры 245
- Экситон** 248*, 288, 289
- π -Электронная система 243
- Электронно-колебательная связь сильная 269
- — слабая 269
- Электронно-колебательные взаимодействия в молекулах 264, 266*, 270*
- Электронно-конформационные взаимодействия 275, 276*
- Электронные переходы 236, 245*, 265
- состояния молекул синглетные 194, 195*, 196, 242*
- — — триплетные 196, 242*
- спектры биополимеров 245
- уровни в молекуле 194, 196*, 242*, 247*
- Электронный парамагнитный резонанс 199, 200*, 204*, 206*
- терм 265
- Электрон-транспортная цепь, перенос электронов 75
- Энергетическая зона 248
- Энергетические уровни, расщепление 240
- Энергия внутреннего вращения полипептидной цепи 146
- конформационная биополимеров 144, 149, 150*
- свободная 83, 87
- связи 133
- электронного возбуждения 282
- Энтропия 80, 83, 95*, 109, 111, 112
- открытой системы 85
- — — скорость возникновения 88
- связь с биологической информацией 112, 113
- Эффект Мёссбауэра 214, 217, 227*
- Ядро мёссбауэровское** 217, 218*

Оглавление

Предисловие	3
Введение	6

Часть первая Биофизика сложных систем

Раздел I. Кинетика биологических процессов	11
--	----

Глава I. Качественные методы исследования динамических моделей биологических процессов	13
--	----

§ 1. Общие принципы описания кинетического поведения биологических систем	13
§ 2. Качественное исследование простейших моделей биологических процессов	17
§ 3. Качественные методы исследования систем дифференциальных уравнений	21

Глава II. Типы динамического поведения биологических систем	32
---	----

§ 1. Биологические триггеры	32
§ 2. Колебательные процессы в биологии. Предельные циклы	36
§ 3. Иерархия времен в биологических системах	40
§ 4. Процессы самоорганизации в распределенных биологических системах	45

Глава III. Кинетика ферментативных процессов	55
--	----

§ 1. Простейшие ферментативные реакции	55
§ 2. Множественность стационарных состояний в ферментативных системах	60
§ 3. Колебания в ферментативных системах	64

Глава IV. Вероятностные модели в биофизике	69
--	----

§ 1. Стохастические модели взаимодействия	69
§ 2. Вероятностное описание переноса электрона в мультиферментном комплексе	74

Раздел II. Термодинамика биологических процессов	79
--	----

Глава V. Термодинамика систем вблизи равновесия (линейная термодинамика)	82
--	----

§ 1. Первый и второй законы термодинамики	82
§ 2. Второй закон термодинамики в открытых системах	85
§ 3. Соотношения между значениями движущих сил и скоростей процессов	90
§ 4. Термодинамические критерии достижения и устойчивости стационарных состояний	93

Глава VI. Термодинамика систем вдали от равновесия (нелинейная термодинамика)	100
---	-----

§ 1. Общие критерии устойчивости стационарных состояний	100
§ 2. Термодинамика нелинейных кинетических систем	105
§ 3. Энтропия, информация и биологическая упорядоченность	109

Часть вторая Молекулярная биофизика

Раздел III. Пространственная организация биополимеров	117
---	-----

Глава VII. Пространственные конфигурации полимерных молекул	119
---	-----

§ 1. Статистический характер организации полимеров	119
§ 2. Объемные взаимодействия и переходы глобула — клубок в полимерных макромолекулах	123

§ 3. Фазовые переходы в белках	127
Глава VIII. Различные типы взаимодействий в макромолекулах	130
§ 1. Взаимодействия Ван-дер-Ваальса	130
§ 2. Водородная связь. Заряд-дипольные взаимодействия	135
§ 3. Внутреннее вращение и поворотная изомерия	137
Глава IX. Конформационная энергия и пространственная организация биополимеров	144
§ 1. Конформационная энергия полипептидной цепи	144
§ 2. Пространственная организация белков	151
§ 3. Особенности пространственной организации нуклеиновых кислот	161
§ 4. Состояние воды и гидрофобные взаимодействия в биоструктурах	169
§ 5. Динамика фазовых переходов в макромолекулах	178
Раздел IV. Динамические свойства глобулярных белков	185
Глава X. Динамика белков	186
§ 1. Структурные изменения белков	186
§ 2. Конформационная подвижность белков по данным различных методов	192
Глава XI. Физические модели динамической подвижности белков	221
§ 1. Модель ограниченной диффузии (броуновский осциллятор с сильным затуханием)	221
§ 2. Модель дискретных состояний и фазовых переходов	228
§ 3. Численное моделирование молекулярной динамики белков	229
Раздел V. Электронные свойства биополимеров	235
Глава XII. Электронные переходы в биополимерах	236
§ 1. Квантово-механические представления об электронном строении молекул	236
§ 2. Электронные спектры биополимеров	245
§ 3. Оптическая активность биополимеров	250
Глава XIII. Механизмы переноса электрона и миграции энергии в биоструктурах	254
§ 1. Биологические примеры	254
§ 2. Переходы в двухуровневой системе	257
§ 3. Туннельный эффект	259
§ 4. Переходы в двухуровневой системе при наличии диссипативных процессов	262
§ 5. Электронно-колебательные взаимодействия в молекулах	264
§ 6. Случай сильной и слабой электронно-колебательной связи	269
§ 7. Перенос электрона по белковой цепи	271
§ 8. Динамика электронно-конформационных взаимодействий	275
§ 9. Индуктивно-резонансный механизм	282
§ 10. Обменно-резонансный перенос энергии	286
§ 11. Экситонный механизм	288
Глава XIV. Механизмы ферментативного катализа	291
§ 1. Физико-химическое описание и биофизические модели ферментативных процессов	291
§ 2. Электронно-конформационные взаимодействия в ферментативном катализе	297
§ 3. Динамика фермент-субстратных взаимодействий	299
§ 4. Электронные взаимодействия в активном центре фермента	306
Рекомендуемая литература	313
Предметный указатель	314

Учебное издание

Андрей Борисович Рубин

БИОФИЗИКА. В 2 кн.

Кн. 1. Теоретическая биофизика

Заведующий редакцией А. Н. Гаврилов

Научный редактор О. Р. Кольс

Редактор А. С. Орлова

Младшие редакторы И. М. Павлова, Е. И. Попова

Художник Ю. Д. Федичкин

Художественный редактор Т. А. Коленкова

Технический редактор Л. А. Муравьева

Корректор Г. И. Кострикова

ИБ № 6442

Изд. № Е-511. Сдано в набор 29.08.86. Подп. в печать
23.04.87. Т-10446. Формат 70×100/16. Бум.
офсетная № 1. Гарнитура литературная.

Печать офсетная. Объем 26,0 усл. печ. л. + 0,33 усл.
печ. л. форзац. 52,66 усл. кр.-орт. 25,31 уч.-изд. л. +
+ 0,54 уч.-изд. л. форзац Тираж 25 000 экз.

Зак. № 2055. Цена 1 р. 30 к.

Издательство «Высшая школа», 101430, Москва, ГСП-4,
Неглинная ул., д. 29/14

Московская типография № 4 Союзполиграфпрома при
Государственном комитете СССР по делам издательства,
полиграфии и книжной торговли
129041, Москва, Б. Переяславская, 46