
А. Б. Рубин

ЛЕКЦИИ ПО БИОФИЗИКЕ

Рекомендовано Государственным комитетом Российской Федерации по высшему образованию в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению «Биология», специальности «Биофизика».

ИЗДАТЕЛЬСТВО
МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
1994

ББК 28.071
P82
УДК 577.3

Рецензенты:

кафедра физики живых систем Московского
физико-технического института (зав. каф.
проф. Э. М. Трухан);
доктор физ.-мат. наук проф. С. И. Аксенов;
кафедра биофизики 2-го МОЛГМИ
им. Н. И. Пирогова

Рубин А. Б.

P82 Лекции по биофизике: Учеб. пособие. — М.: Изд-во
МГУ, 1994. — С. 160.

ISBN 5-211-02475-3

Учебное пособие подготовлено на основе курса лекций, читаемого автором на биологическом факультете МГУ, и охватывает практически все основные темы курса биофизики.

Биофизика клеточных процессов освещена в лекциях по мембранному транспорту, трансформация энергии в биомембранах рассмотрена на примере первичных процессов фотосинтеза.

Для студентов и аспирантов биологических специальностей вузов.

1903010000(4309000000)—050
d ————— 101—94
077(02)—94

ББК 28.071

Учебное издание

Рубин Андрей Борисович

ЛЕКЦИИ ПО БИОФИЗИКЕ

Зав. редакцией *И. И. Щехура*

Редактор *Н. М. Горелик*

Художественный редактор *А. Л. Прокошев*

Обложка художника *В. В. Гарбузова*

Технический редактор *Г. Д. Колоскова*

Корректоры *В. И. Долина, Н. М. Микоян*

ИБ № 6253

ЛР № 040414 от 27.03.92

Сдано в набор 22.10.93. Подписано в печать 04.08.94

Формат 60×90^{1/16}. Бумага тип № 2.

Гарнитура литературная. Высокая печать.

Усл. печ. л. 10,0. Уч.-изд. л. 9,84.

Тираж 2000 экз. Заказ № 569. Изд. № 6.

Ордена «Знак Почета» издательство Московского
университета.

103009, Москва, ул. Герцена, 5/7

АО «Чертановская типография».

113545, Москва, Варшавское шоссе, 129а

ISBN 5-211-02475-3

© А. Б. Рубин, 1994

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	4
Лекция 1. ДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ	5
Лекция 2. ТИПЫ ДИНАМИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ	19
Лекция 3. КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ	34
Лекция 4. РАСПРЕДЕЛЕННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ	43
Лекция 5. МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ В ЭКОЛОГИИ	49
Лекция 6. ТЕРМОДИНАМИКА НЕОБРАТИМЫХ ПРОЦЕССОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ ВБЛИЗИ РАВНОВЕСИЯ	62
Лекция 7. ТЕРМОДИНАМИКА СИСТЕМ ВДАЛИ ОТ РАВНОВЕСИЯ	76
Лекция 8. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ СТРОЕНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ	81
Лекция 9. ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА БЕЛКОВ	94
Лекция 10. ФИЗИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ДИНАМИЧЕСКОЙ ПОДВИЖНОСТИ БЕЛКОВ	105
Лекция 11. МИГРАЦИЯ ЭНЕРГИИ И ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНА В БИОСТРУКТУРАХ	111
Лекция 12. МЕХАНИЗМЫ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА	120
Лекция 13. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН. ИОННЫЕ РАВНОВЕСИЯ	126
Лекция 14. ПАССИВНЫЙ ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ	136
Лекция 15. КАНАЛЫ И ПЕРЕНОСЧИКИ. АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ	142
Лекция 16. ТРАНСПОРТ ИОНОВ В ВОЗБУДИМЫХ МЕМБРАНАХ	147
Лекция 17. ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭНЕРГИИ В ФОТОСИНТЕЗЕ	152
Лекция 18. ТРАНСФОРМАЦИЯ ЭНЕРГИИ В БИОМЕМБРАНАХ	158

ПРЕДИСЛОВИЕ

Биофизика — это наука, включающая теоретические построения и модели, основанные на современных физико-химических представлениях. Они отражают физические особенности молекулярной организации и элементарных процессов живого, которые в свою очередь создают молекулярную основу биологических явлений. Изложение полного курса биофизики требует обширного биологического материала, а также дополнительно привлечения современных представлений физики, химии, математики. Это необходимо для того, чтобы учащиеся «почувствовали» специфическую природу и своеобразие молекулярных биологических процессов, увидели, как эти особенности проявляются в биологических системах. Именно в этом состоит суть современного биофизического подхода к анализу биологических процессов. Однако выполнение этой задачи сопряжено с большим объемом трудного учебного материала, освоение которого требует много времени и возможно в основном лишь учащимися близкого к биофизике профиля. Так, учебник по биофизике, вышедший в 1987 г. (*Рубин А. Б.* Биофизика. Кн. 1, 2. М.: Высшая школа, 1987), предназначен в основном для студентов и аспирантов, специализирующихся в области биофизики и отдельных разделов физико-химической биологии, и, конечно, весьма труден для учащихся другого профиля. Вместе с тем изложение теоретических основ и важнейших результатов биофизики для биологов широкого профиля возможно и в рамках семестрового лекционного курса, который автор читает на биологическом факультете МГУ с 1976 г. Этим вызвано появление настоящей книги, которая содержит краткое изложение основных разделов биофизики и предназначена для биологов широкого профиля.

Из-за ограниченности лекционного курса и необходимости сохранения его логической целостности и законченности в данную книгу не вошли многие важные разделы биофизики, которые подробно изложены в учебнике.

Автор считает своим приятным долгом выразить искреннюю признательность сотрудникам кафедры Г. Ю. Ризниченко и Т. Н. Воробьевой за помощь в подготовке рукописи и ряд ценных советов и замечаний.

Лекция 1. ДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Биологическая кинетика. В основе процессов обмена клетки со средой и внутреннего метаболизма лежит сложная сеть организованных определенным образом во времени и пространстве различных реакций. В биологических системах каждый из составных элементов находится в постоянном и неразрывном взаимодействии друг с другом, что и определяет в основном природу динамического поведения целостных биологических систем, механизмы их саморегуляции и управления, называемые биологической кинетикой. В результате этих процессов изменяются концентрации различных веществ, численность отдельных клеток, биомасса организмов; могут изменяться и другие величины, например трансмембранный потенциал в клетке. Основные исходные предпосылки при описании кинетики в биологических системах в общем такие же, как и в химической кинетике.

Считается, что изменения переменных величин в каждый момент времени могут быть описаны соответствующими дифференциальными уравнениями. Кроме переменных величин, кинетическая система обладает набором определенных параметров, которые не изменяются во время наблюдения за ней и характеризуют условия протекания реакций (температура, влажность, рН, электрическая проводимость). Как правило, сами значения констант скоростей реакций определяются такими параметрами.

Рассмотрим простейший пример замкнутой популяции клеток, в которой одновременно происходят процессы размножения и гибели и где в избытке имеются питательные вещества. Возникает вопрос, как меняется численность клеток в такой системе со временем и может ли в ней в конце концов установиться стационарное состояние, когда число клеток меняться не будет. Эта типичная кинетическая задача решается с помощью дифференциальных уравнений. Пусть в некоторый момент времени t концентрация клеток в среде составит N . Скорость изменения концентрации клеток в среде dN/dt складывается из скорости их размножения ($v_{\text{размн}}$) и скорости гибели ($v_{\text{гибели}}$)

$$dN/dt = v_{\text{размн}} - v_{\text{гибели}}.$$

В простом случае скорость размножения — увеличение концентрации клеток в единицу времени — пропорциональна их численности в каждый момент, т. е.

$$v_{\text{разм}} = k_1 N,$$

где k_1 — константа пропорциональности, зависящая от условий среды (температура, наличие питательных веществ и др.).

Аналогично

$$v_{\text{гибели}} = k_2 N,$$

где k_2 — константа, определяющая интенсивность процессов гибели клеток. Отсюда следует, что

$$dN/dt = k_1 N - k_2 N = kN, \quad (1.1)$$

где $k = k_1 - k_2$.

Решив это уравнение, найдем, как меняется со временем концентрация клеток в среде $N = N(t)$. Интегрируя (1.1), получим

$$\int \frac{dN}{N} = \int k dt;$$

$$\ln N = kt + c;$$

$$N = N_0 e^{kt}, \quad (1.2)$$

где N_0 — концентрация клеток в начальный момент времени $t = 0$ наблюдения за системой.

Легко видеть, что в зависимости от соотношения констант скоростей процессов гибели (k_2) и размножения (k_1) судьба этой замкнутой популяции будет различной. Если $k_1 > k_2$, $k > 0$, то в системе произойдет неограниченный рост числа клеток

$$N(t) \rightarrow \infty \text{ при } t \rightarrow \infty.$$

Если $k_1 < k_2$, то со временем популяция будет вымирать

$$N(t) \rightarrow 0 \text{ при } t \rightarrow \infty.$$

И только в частном случае при $k_1 = k_2$ число клеток будет оставаться постоянным

$$N = N_0.$$

Другим примером модели роста популяции в среде с ограниченным количеством питательных веществ служит известное уравнение логистической кривой. Логистическое уравнение Ферхюльста имеет вид

$$dN/dt = k_1 N \left(\frac{N_{\text{max}} - N}{N_{\text{max}}} \right). \quad (1.3)$$

Здесь N_{\max} — максимальная численность популяции, возможная в данных условиях. Кривая $N=N(t)$, описываемая этим уравнением, приведена на рис. (1.1). В начальный период роста, когда $N \ll N_{\max}$, кривая носит экспоненциальный характер. Затем после точки перегиба наклон постепенно уменьшается и кривая приближается к верхней асимптоте $N=N_{\max}$, т. е. к максимально достижимому уровню в данных условиях.

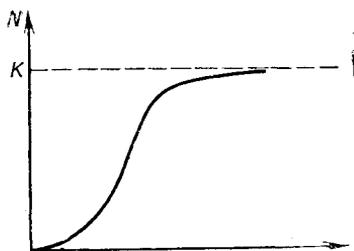


Рис. 1.1. Логистическая кривая

Однако по сравнению с обычной химической кинетикой биологическая кинетика характеризуется следующими особенностями.

1. В качестве переменных выступают не только концентрации веществ, но и другие величины.

2. Переменные изменяются не только во времени, но и в пространстве (диффузия реагентов через биомембраны).

3. Биологическая система пространственно гетерогенная, и условия взаимодействия реагентов могут быть различны в разных точках системы.

4. Существуют специальные механизмы саморегуляции, действующие по принципу обратной связи.

5. Степень полинома, стоящего в правой части дифференциального уравнения, не всегда связана с порядком реакции.

Обычно в качестве простой модели открытой системы приводится гидродинамическая модель сосуда, в который одновременно вливается и вытекает жидкость. Уровень жидкости в сосуде целиком зависит от соотношения скоростей притока и оттока жидкости. При равенстве этих скоростей уровень жидкости остается постоянным, а в системе устанавливается стационарное состояние. Изменение скорости хотя бы одного из потоков вызовет соответствующее смещение стационарного уровня жидкости в сосуде.

Принцип обратной связи. Снабдим нашу гидродинамическую модель специальным устройством, которое будет увеличивать или уменьшать скорость оттока жидкости при поворачивании соответственно крана на выходе из сосуда в зависимости от смещения в нем уровня жидкости. Пример такой системы приведен на рис. 1.2. Поворот крана электромотором происходит по сигналу от фотоэлемента. Возникающий в фотоэлементе ток зависит от степени поглощения света, которая меняется с уровнем жидкости в сосуде. Питание лампочки фотоэлемента и электромотора осуществляется от небольшой турбины, лопасти которой вращаются выходящим потоком воды. В такой модели по принципу обратной связи поддерживается в определенных

пределах уровень жидкости при изменении скорости притока воды за счет саморегуляции. В биологических системах по принципу обратной связи регулируются многие ферментативные реакции, где активность ферментов изменяется в зависимости от концентрации реагентов или внешних условий. В результате концентрация продуктов реакции поддерживается на постоян-

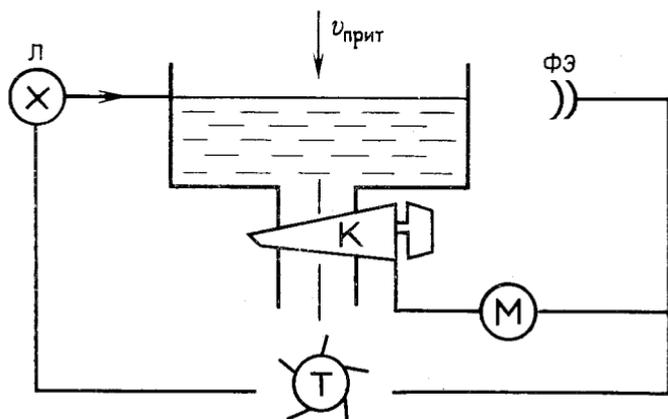


Рис. 1.2. Гидродинамическая модель системы с обратной связью Л — лампа, ФЭ — фотоэлемент, К — кран, М — электромотор, Т — турбина

ном уровне. В биологических системах могут устанавливаться различные стационарные режимы в зависимости от значений управляющих параметров. Возможно также и возникновение колебательных стационарных состояний, когда концентрации промежуточных веществ периодически с постоянной частотой изменяются во времени. Наконец, сочетание химических реакций и диффузионных процессов, в которых реагенты участвуют одновременно, может привести к появлению особого типа пространственной структурной организации в исходно гомогенной системе.

Основная задача для биофизиков состоит в том, чтобы в сложных системах получить характеристики различных динамических режимов и выяснить условия и значения параметров, при которых они реализуются в живой клетке. Это можно обеспечить путем изучения свойств стационарных режимов, их устойчивости, процессов перехода к стационарному состоянию.

Простейшая модель открытой системы. Рассмотрим простейшую открытую систему, в которой происходит обмен веществ a и b с окружающей средой и, кроме того, обратимая реакция первого порядка превращения $a \rightleftharpoons b$. На рис. 1.3 a, b — переменные концентрации внутри системы; A, B — постоянные концент-

рации этих же веществ во внешних резервуарах, k_1, k_2, k_{-2}, k_3 — константы скоростей процессов.

Несмотря на простоту, модель отражает основные черты обменных процессов в клетке. Поступление субстрата и выброс метаболитов во внешнюю среду задается реакциями $A \rightarrow a$, $b \rightarrow B$, а процессам клеточного метаболизма соответствует пре-

вращение $a \rightleftharpoons b$. Например, для процесса дыхания на этапе $A \rightarrow a$ происходит поступление глюкозы и кислорода, этап $b \rightarrow B$ соответствует выбросу CO_2 и H_2O наружу клетки, а весь метаболический дыхательный цикл трансформации молекулы глюкозы представлен реакцией $a \rightleftharpoons b$. Значения констант скоростей носят, конечно, феноменологический обобщенный характер и не могут быть отнесены к какой-то конкретной биохимической стадии. Однако, как мы убедились, и такая, до предела упрощенная, модель отражает основные черты совокупности метаболических реакций клетки как открытой системы.

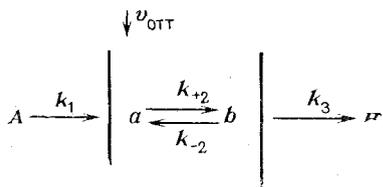


Рис. 1.3. Открытая система — модель обменных процессов в клетке

Уравнение кинетики для этой системы имеют следующий вид:

$$\begin{aligned} \frac{da}{dt} &= k_1(A - a) + k_{-2}b - k_{+2}a = f_1(a, b), \\ \frac{db}{dt} &= k_{+2}a - k_{-2}b - k_3(b - B) = f_2(a, b). \end{aligned} \quad (1.4)$$

Поскольку в стационарном состоянии переменные (a, b) принимают постоянные значения, то

$$\frac{da}{dt} = 0 \quad \text{и} \quad \frac{db}{dt} = 0.$$

Приравняем к нулю правые части (1.4):

$$\frac{da}{dt} = f_1(a, b) = 0; \quad \frac{db}{dt} = f_2(a, b) = 0. \quad (1.5)$$

Мы получим систему алгебраических уравнений:

$$\begin{cases} -(k_1 + k_2)a + k_{-2}b + k_1A = 0, \\ k_{+2}a - (k_{-2} + k_3)b + k_3B = 0, \end{cases} \quad (1.6)$$

из которых найдем стационарные значения \bar{a}, \bar{b} :

$$\bar{a} = \frac{Ak_1(k_{-2} + k_3) + k_3k_{-2}B}{k_1k_{-2} + k_1k_3 + k_2k_3}; \quad \bar{b} = \frac{k_3(k_1 + k_2)B + k_1k_2A}{k_1k_2 + k_1k_3 + k_2k_3}. \quad (1.7)$$

Эти величины не зависят от начальных условий, т. е. от начальных значений $a=a_0$ и $b=b_0$ в момент времени $t=0$, а определяются только величинами констант и концентраций веществ во внешних резервуарах A, B . Это означает, что в каком бы начальном состоянии ни находилась система, в ней в конце концов установится один стационарный режим, при котором $a=\bar{a}$, $b=\bar{b}$. Систему дифференциальных уравнений (1.4) можно решить, если найти в явном виде зависимости $a=a(t)$ и $b=b(t)$, определив, каким образом изменяются с течением времени переменные концентрации.

Решение имеет вид

$$\begin{aligned} a(t) &= c_1 e^{\lambda_1 t} + c_2 e^{\lambda_2 t}, \\ b(t) &= c_1 \chi_1 e^{\lambda_1 t} + c_2 \chi_2 e^{\lambda_2 t}, \end{aligned} \quad (1.8)$$

где c_1, c_2 — константы, зависящие от начальных условий.

При $t=0$, $a_0 = c_1 + c_2$

$$b_0 = c_1 \chi_1 + c_2 \chi_2, \text{ т. е.}$$

$$\begin{aligned} c_1 &= \frac{a_0 \chi_2 - b_0}{\chi_2 - \chi_1}, \\ c_2 &= \frac{b_0 - a_0 \chi_1}{\chi_2 - \chi_1}. \end{aligned} \quad (1.9)$$

Величины λ_1, λ_2 — показатели в экспонентах — определяются из характеристического уравнения

$$\begin{vmatrix} -(k_1 + k_{+2}) - \lambda & k_{-2} \\ k_{+2} & -(k_{-2} + k_3) - \lambda \end{vmatrix} = 0, \quad (1.10)$$

$$\text{или } \lambda^2 + \lambda(k_1 + k_{+2} + k_{-2} + k_3) + (k_1 k_{-2} + k_1 k_3 + k_{+2} k_3) = 0.$$

Величины χ_1, χ_2 определяются из уравнения коэффициентов распределения

$$k_{-2} \chi^2 + (-k_1 - k_{+2} + k_{-2} + k_3) \chi - k_{+2} = 0.$$

При $t \rightarrow \infty$ имеем $e^{-\lambda_1 t} \rightarrow 0$, $e^{-\lambda_2 t} \rightarrow 0$, т. е. $a \rightarrow \bar{a}$ и $b \rightarrow \bar{b}$. Это и означает, что в системе в конце концов при $t \rightarrow \infty$ устанавливается стационарное состояние, не зависящее от начальных условий $a=a_0$ и $b=b_0$. В этом состоит так называемое свойство эквифинальности стационарных состояний, которое присуще открытым системам и часто наблюдается при изучении биологических процессов. Хотя начальные условия не влияют на значения \bar{a} и \bar{b} , они тем не менее определяют конкретный характер кривых изменения $a(t)$ и $b(t)$ и кинетику перехода системы от начальной точки $a=a_0, b=b_0$ в момент $t=0$ в стационарное состояние $a=\bar{a}, b=\bar{b}$ при $t \rightarrow \infty$. На рис. 1.4 приведено несколько видов переходных кривых $a(t)$. Сходные по форме кривые наблюдались, например, в физиологических исследованиях скорости дыхания при различных начальных условиях. Надо

понимать, что вид кривых определяется начальными условиями и значениями постоянных величин $k_1, k_{+2}, k_{-2}, k_3, A, B$ и может меняться в зависимости от их комбинации. Даже из анализа простой системы (1.4) видно, что аналитические решения имеют довольно громоздкий вид и зависят от большого числа параметров. Ясно, что при большом числе переменных такие решения не только трудно получить, но по ним уже сложно выяснить зависимость кинетического поведения системы от параметров. Обратим внимание на то, что уравнения (1.4) содержат в правых частях только линейные члены, куда неизвестные переменные входят в первой степени. Однако в биологических системах процессы, как правило, существенно нелинейны. Так, скорость простейшей бимолекулярной реакции второго порядка описывается математически в виде произведения концентраций реагентов, т. е. в модели такой реакции правые части уравнений содержат нелинейные члены. В этом случае нахождение точных аналитических решений встречается с серьезными математическими трудностями и подчас вообще невозможно.

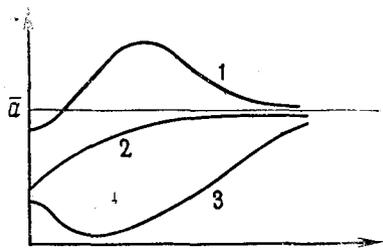


Рис. 1.4. Переходные кривые $a(t)$ для схемы 2: 1 — овершут, 2 — монотонная, 3 — ложный старт

Качественный анализ модели. Основной подход в современной кинетике и математическом моделировании биологических процессов заключается в отказе от нахождения точных аналитических решений дифференциальных уравнений. Идея состоит в получении качественных характеристик динамического поведения системы: устойчивые и неустойчивые стационарные состояния, переходы между ними, колебательные режимы, качественная зависимость поведения системы от критических значений параметров. Многие из этих вопросов решаются методами качественной теории дифференциальных уравнений, которые позволяют выявить важные общие свойства модели, не прибегая к нахождению в явном виде неизвестных функций. Наиболее важным свойством стационарного состояния является его устойчивость. Эта устойчивость определяется способностью системы самопроизвольно возвращаться в стационарное состояние после внесения внешних возмущений, отклоняющих систему от исходной стационарной точки.

Устойчивость стационарной точки. Возьмем простейшую открытую систему

$$A \xrightarrow{V_{\text{прит}}} |a| \xrightarrow{V_{\text{отт}}}$$

в которую поступает вещество, а из внешнего резервуара с постоянной скоростью $V_0 = V_{\text{прит}} = \text{const}$.

Уравнение кинетики имеет простой вид:

$$\frac{da}{dt} = V_{\text{прит}} - V_{\text{отт}} = V_0 - ka = f(a), \quad (1.11)$$

где k — константа скорости $V_{\text{отт}}$. Решить уравнение (1.11) очень просто. Попробуем, однако, найти значение стационарной точки $a = \bar{a}$ и определить ее устойчивость графически, не прибегая к точному решению уравнения (1.11). Очевидно, стационарное состояние $\frac{da}{dt} = 0$ в (1.11) устанавливается при том значении $a = \bar{a}$, когда скорости притока и оттока становятся равными друг другу ($V_{\text{прит}} = V_{\text{отт}}$).

На рис. 1.5 построены зависимости от a величин скоростей $V_{\text{прит}} = V_0$ и $V_{\text{отт}} = ka$. Графики $V_{\text{прит}}$ и $V_{\text{отт}}$ являются прямыми линиями, которые пересекаются в точке, где $V_{\text{прит}} = V_{\text{отт}}$, т. е. в стационарной точке $a = \bar{a}$.

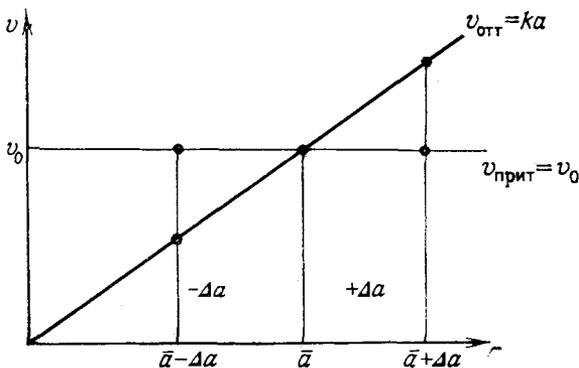


Рис. 1.5. Зависимость скоростей притока ($v_{\text{прит}}$) и оттока ($v_{\text{отт}}$) от величины a

Посмотрим теперь, устойчива ли эта точка. Допустим, что в нашей системе, находящейся в стационарном состоянии $a = \bar{a}$, возникло случайное возмущение, вызвавшее увеличение стационарной концентрации \bar{a} на величину Δa и уводящее тем самым систему от точки \bar{a} в соседнюю точку $\bar{a} + \Delta a$. В новом возмущенном состоянии, где $a = \bar{a} + \Delta a$ величины $V_{\text{прит}}$ и $V_{\text{отт}}$ уже не равны друг другу и, следовательно, концентрация $\bar{a} + \Delta a$ начнет изменяться. Как видно из графиков, в точке $\bar{a} + \Delta a$ соотношение величин $V_{\text{прит}}$ и $V_{\text{отт}}$ таково, что здесь $V_{\text{отт}} > V_0$. А это означает, что в системе будет самопроизвольно уменьшаться и концентрация a ($\bar{a} + \Delta a$), вместе с ней и ско-

рость притока $V_{\text{прит}} = ka$ до тех пор, пока вновь не восстановится равенство скоростей $V_{\text{прит}} = V_{\text{отт}}$, когда $a = \bar{a}$.

Легко видеть, что аналогичная картина будет наблюдаться, если случайное отклонение от точки $a = \bar{a}$ приведет к уменьшению стационарной концентрации a и переводу системы в точку $\bar{a} - \Delta a$. Поскольку здесь $V_{\text{отт}} < V_0$, то в этой области произойдет рост величины $\bar{a} - \Delta a$ и скорости оттока до тех пор, пока $V_{\text{отт}}$ не станет равной V_0 , а система вернется в первоначальное положение $a = \bar{a}$. Таким образом, случайные отклонения от стационарной точки ($\pm \Delta a$) компенсируются самой системой, которая находится в устойчивом стационарном состоянии.

Критерий устойчивости. Существует простой аналитический метод определения устойчивости стационарного состояния, которым мы воспользуемся и при исследовании моделей биологических процессов, состоящих из двух уравнений.

Возьмем простейшую математическую модель, которой в общем виде соответствует одно дифференциальное уравнение первого порядка:

$$\frac{da}{dt} = f(a), \quad (1.12)$$

где правая часть $f(a) = V_{\text{прит}} - V_{\text{отт}}$ может иметь любой вид. Пусть система обладает стационарной точкой $a = \bar{a}$, где

$\left. \frac{da}{dt} \right|_{a=\bar{a}} = 0$ и, следовательно, $f(\bar{a}) = 0$. Посмотрим, каким образом

устойчивость точки $a = \bar{a}$ связана со свойствами функции $f(a)$. Дадим отклонение $\xi = \Delta a$ около стационарной точки $a = \bar{a}$, такое, что разность

$$\xi = a - \bar{a} \quad (1.13)$$

есть небольшая величина

$$\left| \frac{\xi}{\bar{a}} \right| = \left| \frac{a - \bar{a}}{\bar{a}} \right| < 1.$$

Подставим в (1.12) величину $a = \bar{a} + \xi$ из (1.13). Получим

$$\frac{d(\bar{a} + \xi)}{dt} = \frac{d\xi}{dt} = f(\bar{a} + \xi). \quad (1.14)$$

Разложим в ряд Тейлора функцию $f(\bar{a} + \xi)$ около точки \bar{a} :

$$\frac{d\xi}{dt} = f(\bar{a} + \xi) = f(\bar{a}) + \left(\frac{df}{da} \right)_{a=\bar{a}} \xi + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2f}{da^2} \right)_{a=\bar{a}} \xi^2 + \dots \quad (1.15)$$

Поскольку в стационарной точке $f(\bar{a}) = 0$, то, ограничиваясь величинами первого порядка, найдем, что

$$\frac{d\xi}{dt} = f'(a) \Big|_{\bar{a}} \xi. \quad (1.16)$$

Это уравнение определяет поведение во времени возмущения ξ около стационарной точки. Из (1.16) следует, что изменение $\xi = \xi(t)$ имеет вид

$$\xi = \xi_0 e^{f'_a(\bar{a})t}, \quad (1.17)$$

где ξ_0 — величина начального отклонения в момент $t=0$. Ясно, что если $f'_a(\bar{a}) < 0$, то $\xi \rightarrow 0$ при $t \rightarrow \infty$, т. е. отклонение со временем исчезает, а система возвращается в стационарную точку \bar{a} , которая таким образом устойчива. Наоборот, в неустойчивом состоянии \bar{a} первоначальное отклонение с течением времени будет возрастать, условием чего служит неравенство $f'_a(\bar{a}) > 0$. В этом случае из (1.17) следует, что $\xi \rightarrow \infty$ при $t \rightarrow \infty$. Таким образом, знак производной правой части дифференциального уравнения в стационарной точке указывает на характер устойчивости стационарного состояния. Легко проверить, что для системы (1.11) значение $f'(a)$ в точке \bar{a} равно $f'_a(\bar{a}) = -k < 0$, т. е. при любых $a = \bar{a}$ стационарное состояние устойчиво.

Несколько стационарных точек. В сложной системе могут протекать реакции второго и более высоких порядков. Тогда в алгебраическом уравнении $f(\bar{a}) = 0$ для определения координат стационарной точки появится несколько корней, это соответствует тому, что наша система может обладать несколькими стационарными состояниями.

Рассмотрим модель проточного культиватора, где концентрация c меняется из-за того, что происходит размножение бактериальных клеток (γc^2), их гибель ($-\beta c$) и приток извне с заданной постоянной скоростью V_0 , которую мы можем менять при необходимости. Модель имеет вид

$$\frac{dc}{dt} = V_0 - \beta c + \gamma c^2 = f(c). \quad (1.18)$$

Положим величину γ , для простоты равной единице. Приравняв к нулю $f(\bar{c}) = 0$, найдем, что в нашей системе имеются две стационарные точки:

$$\begin{aligned} \bar{c}_1 &= \frac{\beta}{2} + \sqrt{\frac{\beta^2}{4} - V_0}, \\ \bar{c}_2 &= \frac{\beta}{2} - \sqrt{\frac{\beta^2}{4} - V_0}. \end{aligned} \quad (1.19)$$

Точка \bar{c}_1 является неустойчивой, так как для нее

$$f'_{\bar{c}_1}(c) = 2\bar{c}_1 - \beta = 2\sqrt{\frac{\beta^2}{4} - V_0} > 0,$$

а точка \bar{c}_2 , наоборот, устойчива:

$$f'_{\bar{c}_2}(c) = 2\bar{c}_2 - \beta = -2\sqrt{\frac{\beta^2}{4} - V_0} < 0.$$

Обратим внимание на то, что в зависимости от величины V_0 может меняться число стационарных точек. Из (1.19) видно, что если при $V_0 < \frac{\beta^2}{4}$ возможны два стационарных режима \bar{c}_1 и \bar{c}_2 ,

то при $V_0 = \frac{\beta^2}{4}$ имеется только одно стационарное состояние

$\bar{c}_1 = \bar{c}_2 = \frac{\beta}{2}$. При $V_0 > \frac{\beta^2}{4}$ стационарное состояние вообще не

наступает, так как \bar{c}_1 , \bar{c}_2 становятся мнимыми числами, что невозможно. Таким образом, изменяя V_0 , мы тем самым влияем не только на координаты стационарных точек, но и можем изменить их число. Значение $V_0 = \frac{\beta^2}{4}$, при котором происходит

изменение числа стационарных состояний, или, как увидим дальше, типа их устойчивости, называется бифуркационным Параметр V_0 является здесь управляющим.

Редукция числа уравнений. Как видно, ряд важных свойств стационарных состояний можно выявить, изучая свойства правых частей дифференциальных уравнений и не прибегая к их точному аналитическому решению. Однако такой подход дает хорошие результаты при исследовании моделей, состоящих из небольшого числа, чаще всего из двух уравнений. Ясно, что если мы хотим учесть все переменные концентрации промежуточных веществ, принимающих участие даже в простых биохимических циклах, число уравнений в модели окажется весьма большим. Поэтому для успешного анализа необходимо будет провести редукцию числа уравнений в исходной модели и сведение ее к модели, состоящей из небольшого числа уравнений, которые тем не менее отражают наиболее важные динамические свойства системы. Это уменьшение числа уравнений не может происходить произвольно, а его осуществление должно подчиняться объективным законам и правилам. В противном случае мы рискуем потерять какие-либо существенные свойства объекта, что не только обеднит нашу модель, но и сделает ее вообще неадекватной моделируемой биологической системе.

Быстрые и медленные переменные. Редукция числа уравнений основана на принципе узкого места или принципе разделения всех переменных в сложных системах на быстрые и медленные. Посмотрим, в чем состоит этот принцип. Гетерогенный характер организации биологических систем проявляется как в структурном, так и в динамическом отношении. Различные функциональные процессы, отдельные метаболические циклы сильно отличаются друг от друга по их характерным временам (τ) и скоростям. В целостной биологической системе одновременно протекают быстрые процессы ферментативного катализа ($\tau 10^{-1} - 10^6$ с), физиологической адаптации ($\tau \sim$ секунды—минуты), репродукции (τ от нескольких минут и больше). Да-

же в пределах одной отдельной цепи взаимосвязанных реакций всегда имеются наиболее медленные и наиболее быстрые стадии. Это и является основой для осуществления принципа узкого места, согласно которому общая скорость превращения вещества во всей цепи реакций определяется наиболее медленной стадией (узким местом). Эта медленная стадия обладает самым большим характерным временем (самой малой скоростью) по сравнению со всеми характерными временами других отдельных стадий. Общее время процесса практически совпадает с характерным временем этого узкого места. Самое медленное звено и является управляющим, поскольку воздействие именно на него, а не на более быстрые стадии, может повлиять и на скорость протекания всего процесса. Таким образом, хотя сложные биологические процессы и включают очень большое число промежуточных стадий, их динамические свойства определяются сравнительно небольшим числом отдельных наиболее медленных звеньев. Это и означает, что исследование можно проводить на моделях, которые содержат существенно меньшее число уравнений. Наиболее медленным стадиям соответствуют медленно меняющиеся, а быстрым стадиям — быстро меняющиеся переменные величины. Это имеет глубокий смысл. Если мы воздействуем каким-то образом на такую систему (внесем в нее какое-то возмущение), то в ответ все переменные концентрации взаимодействующих веществ начнут соответственно изменяться. Однако это будет происходить с существенно разными скоростями для разных веществ. В устойчивой системе быстрые переменные быстро отклонятся, но зато и быстро вернутся затем к своим первоначальным значениям. Наоборот, медленные переменные будут долго изменяться в ходе переходных процессов, которые и определяют динамику изменений во всей системе. В реальных условиях система испытывает внешние «толчки», которые приводят к видимым изменениям медленных переменных, однако быстрые переменные будут в основном пребывать около своих стационарных значений. Тогда для быстрых переменных вместо дифференциальных уравнений, описывающих их поведение во времени, можно записать алгебраические уравнения, определяющие их стационарные значения. Таким путем осуществляется редукция числа дифференциальных уравнений полной системы, которая теперь будет включать лишь медленные переменные, зависящие от времени.

Допустим, что у нас имеются два дифференциальных уравнения для двух переменных x и y такие, что

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= AF(x, y), \\ \frac{dy}{dt} &= Q(x, y), \end{aligned} \tag{1.20}$$

где $A \gg 1$ — большая величина. Это означает, что произведение $AF(x, y)$ — большая величина, а следовательно, скорость изме-

нения dx/dt тоже большая. Отсюда следует, что x — быстрая переменная. Обозначим и разделим правую и левую части первого уравнения на A . Получим

$$\begin{aligned} \varepsilon \frac{dx}{dt} &= F(x, y), \\ \frac{dy}{dt} &= Q(x, y), \end{aligned} \quad (1.21)$$

где $\varepsilon \ll 1$. ($\varepsilon = 1/A$).

Видно, что при $\varepsilon \rightarrow 0$

$$\varepsilon \frac{dx}{dt} = F(x, y) = 0.$$

Значит, дифференциальное уравнение для переменной x можно заменить алгебраическим

$$F(x, y) = 0,$$

в котором x принимает стационарное значение, зависящее от y , как от параметра, т. е. $x = x(y)$. В этом смысле медленная переменная y является управляющим параметром, меняя который можно влиять на координаты стационарной точки $x(y)$. В приведенном выше примере (1.18) проточного культиватора роль такого управляющего параметра выполняла величина V_0 — скорость поступления клеток. Медленно изменяя эту величину, мы каждый раз вызывали относительно быстрое установление в системе стационарной концентрации клеток (c — быстрая переменная). Добавив к (1.18) уравнение, описывающее это более медленное изменение V_0 во времени, мы могли бы получить полное описание системы с учетом быстрой (c) и медленной (V_0) переменных.

В одной и той же биологической системе роль узкого места и медленной стадии могут выполнять разные звенья цепи в зависимости от внешних условий. Рассмотрим, например, характер световой кривой фотосинтеза — зависимости скорости выделения кислорода от интенсивности освещения (I) (рис. 1.6). На участке OA этой кривой при недостатке света узким местом всего процесса фотосинтетического выделения O_2 являются начальные фотохимические стадии поглощения и трансформации энергии света в пигментном аппарате. Отметим, что сами по себе эти процессы от температуры практически не зависят. Именно поэтому при низких освещенностях общая скорость фо-

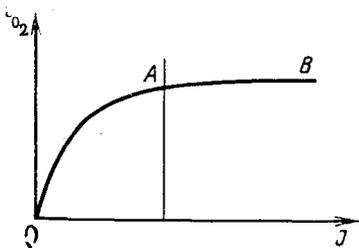


Рис. 1.6. Зависимость скорости выделения кислорода (v_{O_2}) от интенсивности освещения (I) при фотосинтезе

тосинтеза, или скорость выделения O_2 , как известно, очень мало изменяется с температурой в физиологическом диапазоне ($+5^\circ - +30^\circ$). На этом участке световой кривой роль быстрой переменной играют темновые процессы транспорта электронов, которые легко реагируют на любые изменения условий освещения и соответственно электронного потока от реакционных центров фотосинтетического аппарата при низких освещенностях.

Однако при более высоких интенсивностях на участке *AB* световой кривой лимитирующей стадией становятся уже темновые биохимические процессы переноса электрона и разложения воды. В этих условиях при больших *I* темновые процессы становятся узким местом. Они не справляются с мощным потоком электронов, идущим от пигментного аппарата при больших освещенностях, что и приводит к световому насыщению фотосинтеза. На этом этапе в силу ферментативной природы темновых процессов повышение температуры вызывает их ускорение и тем самым уже увеличивает общую скорость фотосинтеза (выделения кислорода) в условиях светового насыщения фотосинтеза. Здесь роль управляющей медленной стадии выполняют темновые процессы, а быстрой стадии соответствуют процессы миграции энергии и ее трансформации в реакционных центрах.

Лекция 2. ТИПЫ ДИНАМИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Современная практика математического моделирования показала, что наиболее содержательные и вместе с тем не слишком «перегруженные» деталями модели содержат, как правило, два уравнения.

Именно в том случае, когда, пользуясь разделением переменных на быстрые и медленные, удастся свести исходную систему к виду

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= P(x, y), \\ \frac{dy}{dt} &= Q(x, y), \end{aligned} \tag{2.1}$$

успешно используют качественные методы исследования подобных систем. В процессе изменения состояния системы во времени переменные x , y изменяются согласно уравнениям (2.1) так, что каждому состоянию соответствует пара значений (x, y) . Иными словами, измеряя в последовательные моменты времени t_1, t_2, \dots, t_n значения переменных x, y , мы представляем состояние системы в виде соответствующих пар $(x_1, y_1), (x_2, y_2), \dots, (x_n, y_n)$.

Метод фазовой плоскости. Рассмотрим плоскость с осями координат, на которых отложены значения переменных x, y .

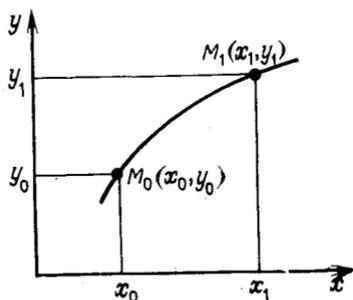


Рис. 2.1. Участок фазовой траектории на фазовой плоскости (x, y) . $M(x, y)$ — изображающая точка

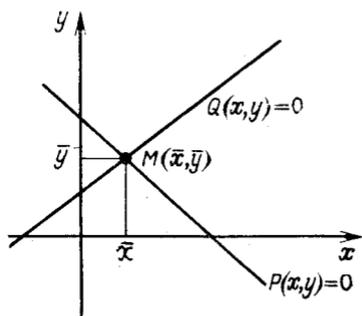


Рис. 2.2. Нахождение особой точки системы 2.3

Каждая точка M этой плоскости с координатами (x, y) соответствует определенному состоянию системы. Такая плоскость носит название фазовой плоскости, а точка $M(x, y)$ называется изображающей точкой (рис. 2.1). Пусть момент $t=t_0$ — координаты изображающей точки $M_0(x_0, y_0)$. В каждый следующий момент времени t изображающая точка будет двигаться в соответствии с системой уравнений (2.1) и каждый раз принимать положение $M(x, y)$ в зависимости от значений $x(t)$, $y(t)$. Совокупность этих точек на фазовой плоскости x, y называется фазовой траекторией.

Характер фазовых траекторий отражает общие качественные черты поведения системы во времени или, как говорят, дает «фазовый портрет» системы. Нас будет интересовать фазовый портрет системы вблизи стационарной, или особой, точки. Согласно определению стационарного состояния в особой точке одновременно

$$\begin{aligned} P(x, y) &= 0, \\ Q(x, y) &= 0. \end{aligned} \quad (2.2)$$

Следовательно, для нахождения особой точки необходимо построить на фазовой плоскости кривые $P(x, y) = 0$ и $Q(x, y) = 0$. Точка пересечения этих кривых и будет особой точкой, а ее координаты будут иметь стационарные значения \bar{x} , \bar{y} . В качестве примера рассмотрим вновь систему (1.4), где вместо переменных a и b введем обозначения $x=a$, $y=b$.

Перепишем систему (1.4) в виде

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= (k_1 - k_{+2})x + k_{-2}y - k_1A = P(x, y), \\ \frac{dy}{dt} &= k_{+2}x - (k_{-2} + k_3)y + k_3B = Q(x, y). \end{aligned} \quad (2.3)$$

Приравняв к нулю правые части (2.3) в соответствии с (2.2), мы получим уравнения кривых $P(x, y) = 0$ и $Q(x, y) = 0$ для нахождения особой точки

$$P(x, y) = 0 \rightarrow y = \frac{1}{k_{-2}} [- (k_1 - k_{+2}) + k_1A] \quad (2.4)$$

и

$$Q(x, y) = 0 \rightarrow y = \frac{1}{k_{-2} + k_3} [k_{+2}x + k_3B].$$

Учитывая, что $k_1 > k_{+2}$, запишем уравнения (2.4) в виде

$$\begin{aligned} y &= -c_1x + c_2, \\ y &= c_3x + c_4, \end{aligned} \quad (2.5)$$

где c_1, c_2, c_3, c_4 — положительные константы — легко определяются из (2.4).

Графики функций (2.5) представляют собой прямые линии, точка пересечения которых и есть особая стационарная точка

(x, y) системы (рис. 2.2). В случаях нелинейных уравнений второго порядка графики функций $P(x, y) = 0$ и $Q(x, y) = 0$ не являются прямыми линиями и могут пересекаться друг с другом в нескольких особых точках, что соответствует нескольким стационарным режимам (рис. 2.3).

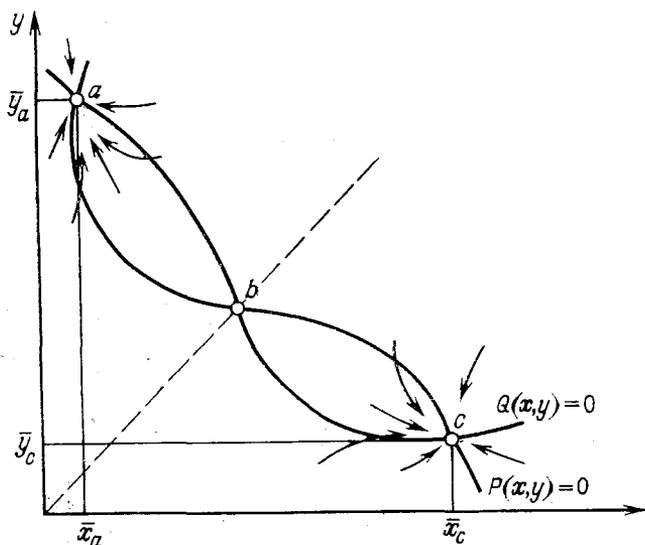


Рис. 2.3. Случай трех особых точек на фазовом портрете — фазовый портрет триггерной системы: a, c — устойчивые особые точки, b — неустойчивая особая точка

Типы устойчивости особых точек. Наша задача состоит теперь в определении типа устойчивости особых точек по виду правых частей исходной системы уравнений (2.1). Прежде всего ясно, что в окрестности устойчивой особой точки изображающая точка $M(x, y)$ будет к ней приближаться по фазовым траекториям и, наоборот, удаляться от нее в случае неустойчивого режима. Так, на рис. 2.3 особые точки a и c — устойчивые, b — неустойчивая, что видно по направлению фазовых траекторий на фазовом портрете.

Допустим, что на фазовом портрете имеется особая точка $M(\bar{x}, \bar{y})$, устойчивость которой мы хотим определить (рис. 2.4). Будем исходить из тех же представлений о свойствах устойчивых состояний, что и при изучении устойчивости стационарных точек в случае уравнения с одной переменной (лекция 1).

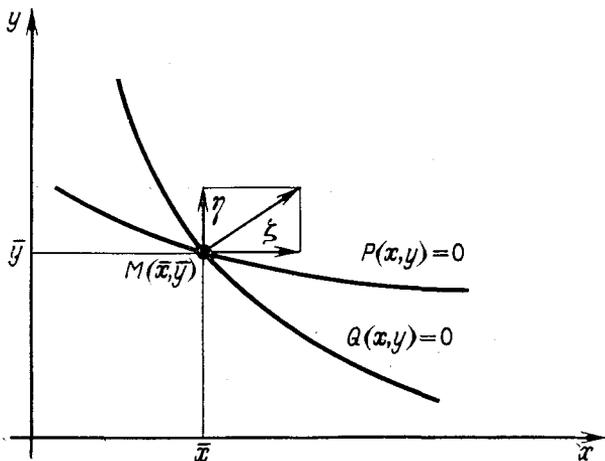


Рис. 2.4. Определение устойчивости особой точки $M(\bar{x}, \bar{y})$

Пусть наша система имеет небольшое отклонение от стационарного положения с некоторыми смещениями по переменным x, y , равными

$$x - \bar{x} = \xi, \quad y - \bar{y} = \eta. \quad (2.6)$$

Подставив эти выражения в (2.1), получим

$$\begin{aligned} \frac{d\xi}{dt} &= P(\bar{x} + \xi, \bar{y} + \eta), \\ \frac{d\eta}{dt} &= Q(\bar{x} + \xi, \bar{y} + \eta). \end{aligned} \quad (2.7)$$

Теперь необходимо разложить правые части (2.7) в ряд Тейлора около точки (\bar{x}, \bar{y}) . В результате получим уравнения для изменения во времени величин ξ, η

$$\begin{aligned} \frac{d\xi}{dt} &= a\xi + b\eta, \\ \frac{d\eta}{dt} &= c\xi + d\eta, \end{aligned} \quad (2.8)$$

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

$$\begin{aligned} a &= P'_x(\bar{x}, \bar{y}), \quad b = P'_y(\bar{x}, \bar{y}), \\ c &= Q'_x(\bar{x}, \bar{y}), \quad d = Q'_y(\bar{x}, \bar{y}). \end{aligned} \quad (2.9)$$

Ясно, что теперь для определения характера устойчивости необходимо одновременно учитывать поведение во времени отклонений ξ и η по обоим переменным x и y . Однако эти отклонения могут уже не одинаково изменяться со временем, а это значит, что в окрестности особой точки фазовые траектории будут вести себя в зависимости от характера изменения обеих переменных.

Общее решение системы (2.8) для переменных ξ , η имеет вид

$$\begin{aligned}\xi(t) &= c_{11}e^{\lambda_1 t} + c_{12}e^{\lambda_2 t}, \\ \eta(t) &= c_{21}e^{\lambda_1 t} + c_{22}e^{\lambda_2 t},\end{aligned}\tag{2.10}$$

где показатели экспонент λ_1 , λ_2 следующим образом зависят от значений обеих частных производных в точке (\bar{x}, \bar{y}) (2.9):

$$\lambda_{1,2} = \frac{a+d}{2} \pm \sqrt{\frac{(a+d)^2}{4} + bc - ad}.\tag{2.11}$$

Если в (2.11) подкоренное выражение отрицательно, то $\lambda_{1,2}$ — комплексно-сопряженные числа. Поведение переменных ξ , η в (2.10), соответствующее поведению переменных x , y в окрестности особой точки (\bar{x}, \bar{y}) , зависит от вида показателей экспонент λ_1 , λ_2 .

1. Показатели λ_1 , λ_2 — действительные отрицательные числа ($\lambda_1, \lambda_2 < 0$), тогда отклонения ξ , η от стационарного положения \bar{x} , \bar{y} со временем уменьшаются. Особая точка носит название **устойчивый узел** (рис. 2.5, а).

2. Показатели действительные и положительные числа ($\lambda_{1,2} > 0$). Особая точка — **неустойчивый узел** (рис. (2.5, б).

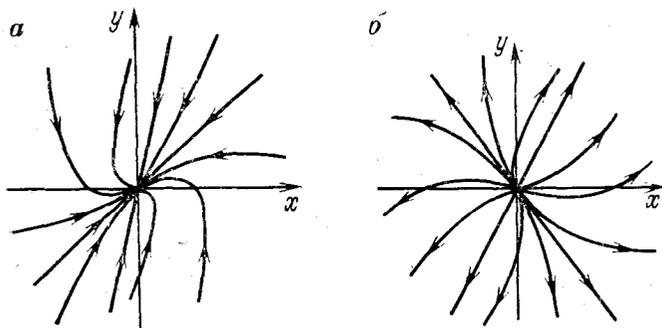


Рис. 2.5. Устойчивый (а) и неустойчивый (б) узел на фазовой плоскости (x, y)

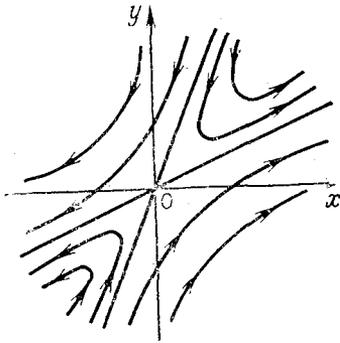


Рис. 2.6. Особая точка типа «седло» на фазовой плоскости (x, y)

3. Показатели действительные числа разных знаков. Особая точка — **седло** (рис. 2.6).

Как видно, из любого начального положения на плоскости (кроме самой особой точки и сепаратрисы) изображающая точка будет удаляться от стационарного положения.

Если показатели — комплексно-сопряженные числа, то изменение во времени переменных ξ, η носит колебательный характер.

4. Действительные части $\lambda_{1,2}$ — отрицательные ($\text{Re} \lambda_{1,2} < 0$) — колебания затухают.

Особая точка — **устойчивый фокус** (рис. 2.7, а).

5. Действительные части $\text{Re} \lambda_{1,2} > 0$ — амплитуда колебаний со временем нарастает. Особая точка — **неустойчивый фокус** (рис. 2.7, б).

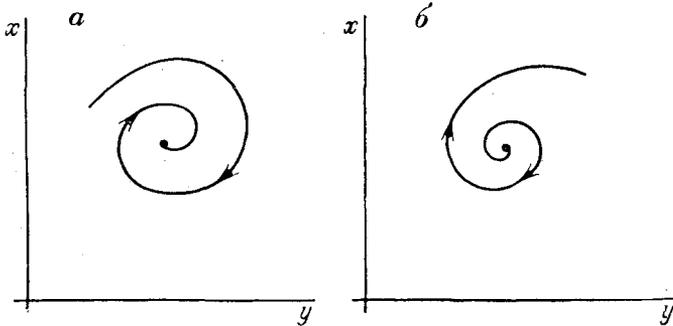


Рис. 2.7. Устойчивый (а) и неустойчивый (б) «фокус» на фазовой плоскости (x, y)

6. В случае, когда $\text{Re} \lambda_{1,2} = 0$, то $\lambda_{1,2}$ — чисто мнимые числа, а фазовые траектории в окрестности особой точки представляют собой эллипсы, которые не проходят через особую точку (рис. 2.8).

Небольшие возмущения переводят систему с одной эллипсоидальной траектории на другую. При этом изменяется амплиту-

да колебаний, а точка «центр» в целом является неустойчивой. Первые пять типов состояния равновесия являются грубыми; их характер не изменяется при небольших изменениях правых частей исходных уравнений (2.1) и их производных первого порядка. В случае «центра» в (2.11)

$$\operatorname{Re} \lambda_{1,2} = \frac{a+d}{2} = 0,$$

что выполняется только при $a = -d$, кроме того, $bc < 0$, $|bc| > |ad|$. Ясно, что небольшие изменения правых частей (2.1) легко могут нарушить эти соотношения и тем самым изменить сам тип устойчивости «центр», приводя к появлению на фазовом портрете системы других особых точек. Поэтому особая точка «центр» характеризует негрубые системы.

Отметим, что устойчивые биологические системы должны обладать определенным «запасом грубости», что позволяет им сохранять основные динамические свойства при относительно небольших внешних воздействиях.

Пример 1. Пусть имеется открытая система, где последовательная цепь превращений протекает по схеме



где A , B — внешние резервуары, а превращение вещества x в вещество y протекает по реакции второго порядка. Если приток из внешнего резервуара происходит с постоянной скоростью V_0 , а отток y наружу описывается уравнением первого порядка, то открытой системе (2.12) соответствуют дифференциальные уравнения:

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= V_0 - k_1xy, \\ \frac{dy}{dt} &= k_1xy - k_2y, \end{aligned} \quad (2.13)$$

где k_1 , k_2 — константы скоростей. Координаты особой точки легко найти из условия $\frac{dx}{dt} = 0$, $\frac{dy}{dt} = 0$:

$$\begin{aligned} V_0 - k_1\bar{x}\bar{y} &= 0, \\ k_1\bar{x}\bar{y} - k_2\bar{y} &= 0. \end{aligned} \quad (2.14)$$

Они равны

$$\bar{x} = k_2/k_1, \quad \bar{y} = V_0/k_2. \quad (2.15)$$

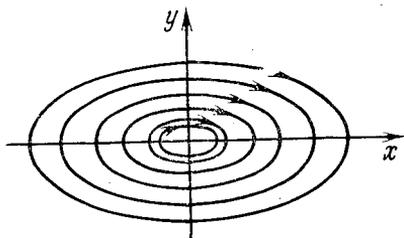


Рис. 2.8. Особая точка типа «центр» на фазовой плоскости (x, y)

Теперь нам надо определить тип устойчивости этой точки. Воспользовавшись выражениями (2.11) и (2.9), найдем, что

$$a = -\frac{k_0 k_1}{k_2}, \quad b = -k_2, \quad c = \frac{V_0 k_1}{k_2}, \quad d = 0, \quad (2.16)$$

$$\lambda_{1,2} = \frac{1}{2} \left(\frac{V_0 k_1}{k_2} \pm \sqrt{\left(\frac{V_0 k_1}{k_2} \right)^2 - 4V_0 k_1} \right).$$

Видно, что особая точка устойчива, так как $\operatorname{Re} \lambda_{1,2} = -\frac{V_0 k_1}{k_2} < 0$. При $4k_2^2 > V_0 k_1$ подкоренное выражение отри-

цательно и особая точка есть устойчивый фокус, а при обратном соотношении — устойчивый узел. Таким образом, в зависимости от соотношения величин констант скоростей образуются затухающие колебания концентраций переносчиков ($4k_2^2 > V_0 k_1$) или монотонное приближение к стационарному состоянию ($4k_2^2 < V_0 k_1$). Соотношение параметров $4k_2^2 = V_0 k_1$ является бифуркационным, т. е. при этом меняется тип устойчивости особой точки системы уравнений (2.13).

Пример 2. Рассмотрим модель Вольтерра хищник — жертва, которая отражает изменение численности популяций жертв (x) и хищников (y), взаимодействующих друг с другом по механизму «свободных соударений». Это значит, что численность жертв пропорциональна вероятности встречи их с хищниками, т. е. пропорциональна произведению (xy). По такому же закону увеличивается и численность хищников в результате их встреч с жертвами. В уравнениях (2.13) этот член соответствует бимолекулярной реакции (типа kxy). Кроме того, происходит процесс естественной смертности хищников со скоростью, пропорциональной их количеству, т. е. по реакции первого порядка ($-ky$). Жертвы размножаются со скоростью, также пропорциональной их численности в условиях, когда количество пищи для них неограниченно.

В этих упрощенных предположениях соответствующие уравнения имеют вид

$$\frac{dx}{dt} = \varepsilon_1 x - \gamma_1 xy, \quad (2.17)$$

$$\frac{dy}{dt} = \gamma_2 xy - \varepsilon_2 y,$$

где ε_1 , γ_1 , γ_2 , ε_2 — соответствующие константы скоростей, или коэффициенты пропорциональности.

Ненулевые стационарные значения координат особой точки системы (2.17).

$$\bar{x} = \frac{\varepsilon_2}{\gamma_1}, \quad \bar{y} = \frac{\varepsilon_1}{\gamma_2},$$

в значения показателей $\lambda_{1,2}$ чисто мнимые:

$$\lambda_{1,2} = \pm i\sqrt{\varepsilon_1\varepsilon_2}.$$

Это соответствует особой точке типа «центр» (см. рис. 2.8), которая, как уже говорилось, в целом неустойчива. Данное обстоятельство является серьезным недостатком модели Вольтер-рв. Для улучшения модели предлагается, например, учесть самоограничения в естественных условиях роста обеих популяций путем добавления в правые части уравнений членов второго порядка — $(-\gamma_3x^2)$, $(-\gamma_4y^2)$, — отражающих эффект «тесноты» и конкуренции внутри популяции:

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= \varepsilon_1x - \gamma_1xy - \gamma_3x^2, \\ \frac{dy}{dt} &= \gamma_2xy - \varepsilon_2y - \gamma_4y^2. \end{aligned} \quad (2.18)$$

Естественно, что при $\gamma_3, \gamma_4 = 0$ система сводится к негрубой системе с особой точкой *центр*. Однако при $\gamma_3, \gamma_4 \neq 0$ в зависимости от соотношения параметров система может иметь особую точку *устойчивый фокус*, или при больших γ_3, γ_4 — *устойчивый узел*. На рис. 2.9 изображены кривые изменения во времени

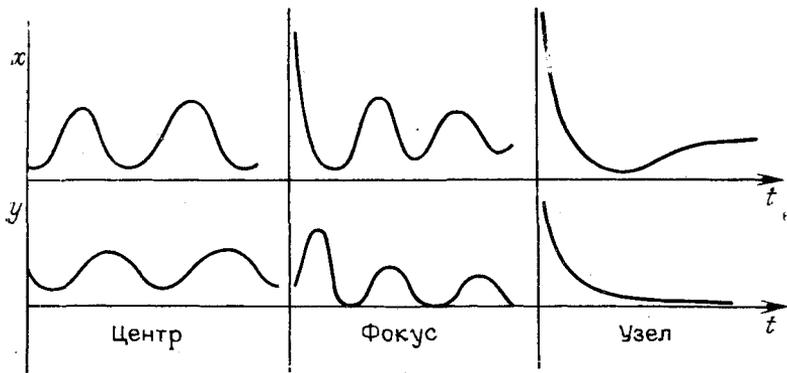


Рис. 2.9. Характер изменения численности x, y во времени при разных типах особых точек

численности $x(t), y(t)$ при различных типах особых точек в системе (2.18). Таким образом, появление в правых частях уравнений даже небольших нелинейных членов вызывает качественное изменение фазового портрета и превращение негрубой особой точки типа центр в грубую особую точку типа устойчивый фокус или узел. Параметры γ_3, γ_4 можно рассматривать как своего рода управляющие параметры, меняющие тип устойчивости стационарного состояния. Ясно, что в моделях других систем можно также найти такого рода управляющие парамет-

ры и бифуркационные соотношения между ними, при которых качественно меняются фазовый портрет системы и тип ее устойчивости.

Биологические триггеры. На рис. 2.3 представлен фазовый портрет системы, обладающей тремя особыми точками: a , c — устойчивые узлы, b — седло. Через седло проходит пунктирная кривая — сепаратриса, разделяющая фазовый портрет системы на области притяжения особых точек a (левее сепаратрисы) и c (правее сепаратрисы). Если система функционирует в устойчивом режиме $a(\bar{x}_a, \bar{y}_a)$, то перевести ее в режим $c(\bar{x}_c, \bar{y}_c)$ можно, например, резко увеличив \bar{x}_a до значений \bar{x}_c , лежащих в области притяжения устойчивого узла c . Тогда система сама

перейдет в режим c по одной из фазовых траекторий. Этот способ переключения режима называется силовым, поскольку для его осуществления необходимо добавить определенное количество вещества. Однако для переключения можно воспользоваться также и зависимостью фазового портрета системы от некоего управляющего параметра. На рис. 2.10 показано, как меняется фазовый портрет системы при изменении такого параметра. Как видно, вначале происходит слияние точек a и b с образованием сложной точки *седло-узел*, а затем на плоскости остается одна устойчивая точка c , к которой система и переходит самостоятельно. Можно затем вернуться к прежним значениям управляющего параметра и восстановить фазовый портрет системы, но при этом она останется в требуемом режиме.

Свойство триггерной системы переключаться из одного режима в другой делает ее полезной при составлении моделей биологических процессов, где имеется набор возможных устойчивых стационарных состояний и переходов между ними. Так, в процессе

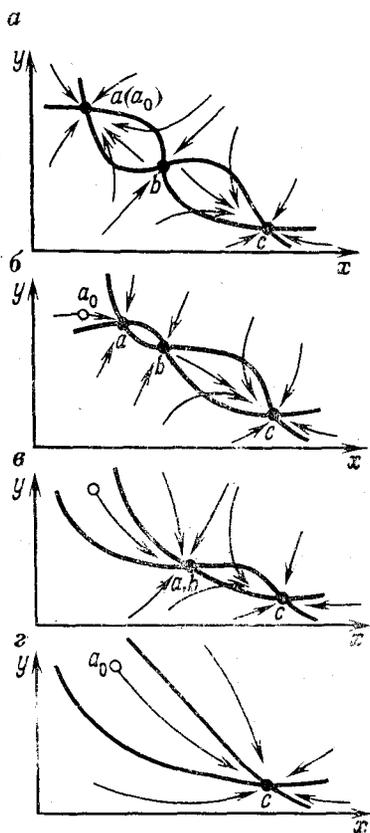


Рис. 2.10. Процесс параметрического переключения триггерной системы на фазовой плоскости

дифференциации тканей происходит такое переключение клетки с соответствующим изменением продуктов биосинтеза. На рис. 2.11 дана схема регуляции белкового синтеза у прокариотов. Продукт второй системы p_2 служит корепрессором первой системы. Он соединяется в активный комплекс с неак-

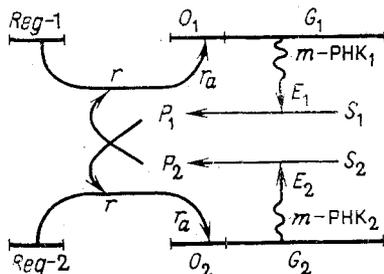


Рис. 2.11. Схема взаимной регуляции двух систем синтеза ферментов (схема Жакоба и Моно)

тивным репрессором гена-регулятора первой системы, тем самым блокируя оперон-участок структурного гена первой системы. Аналогично продукт первой системы p_1 является корепрессором второй.

Анализ математической модели показал, что эта система обладает триггерными свойствами, которые проявляются, если n — порядок реакции репрессии по отношению к концентрации продуктов p_1 и p_2 — составляет $n \geq 2$. Это происходит, когда в корепрессии участвуют две или более молекулы продукта.

Другие примеры триггерных систем мы разберем в лекции 3, посвященной кинетике ферментативных процессов.

Колебательные процессы. Во многих биологических системах наблюдаются периодические процессы: колебания концентраций промежуточных продуктов в гликолизе и фотосинтезе, колебания численности видов, периодические биохимические реакции. Интерес к колебательным биологическим процессам особенно возрос в связи с изучением «биологических часов», в основе которых лежит автоколебательная система внутриклеточных биохимических реакций.

Во всех этих случаях именно внутренние динамические свойства системы, а не какие-либо внешние воздействия являются причиной колебательных изменений. Такие системы называются автоколебательными. Периодическому движению соответствует замкнутая кривая на фазовой плоскости. Если эта замкнутая кривая изолирована, а к ней с внешней и внутренней стороны по спиральям приближаются соседние траектории, то эта изолированная траектория будет устойчивым предельным циклом

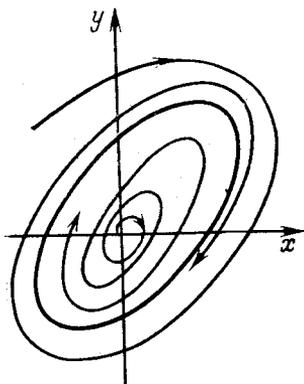
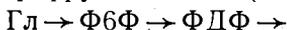


Рис. 2.12. Устойчивый предельный цикл на фазовой плоскости x, y — фазовый портрет колебаний в системе гликолиза

(рис. 2.12). После небольших возмущений система вновь возвращается на траекторию устойчивого предельного цикла. В этом ее отличие от траекторий вокруг особой точки *центр* (рис. 2.8), которая в целом неустойчива. Период и амплитуда движений вдоль траектории предельного цикла не зависят от начальных условий.

Колебания в гликолизе. Гликолитическая цепь — классический пример колебательной биохимической системы. Введение в практику биофизических исследований чувствительных методов спектрофотометрии позволило наблюдать за изменениями концентраций промежуточных веществ непосредственно в интакт-

ной клетке. Опыты на культуре дрожжевых клеток показали, что процессы гликолиза сопровождаются в них периодическими изменениями концентраций промежуточных веществ фруктозо-6-фосфата (Ф6Ф), фруктозо-1,6-дифосфата (ФДФ) и восстановленного НАД. Особенно отчетливо эти колебания наблюдались на голодающих клетках, когда скорость потребления субстрата — глюкозы — мала. Первые попытки моделирования колебательных процессов в гликолизе проводились без учета принципа узкого места. Модель включала 22 уравнения — по числу отдельных стадий гликолиза, и ее исследование не дало определенных результатов по соотношению параметров, при котором возникают колебания. После применения принципа узкого места и разделения переменных на быстрые и медленные в упрощенной модели остались только стадия превращения глюкозы в Ф6Ф и стадия перехода Ф6Ф в ФДФ под влиянием фермента фосфофруктокиназы (ФФК)



Мы уже видели, что проявление особых динамических свойств, в том числе автоколебательных, наблюдается, когда в модели присутствуют нелинейные члены. Этому требованию соответствовало предположение о том, что фермент ФФК активируется продуктом превращения фруктозодифосфатом, т. е.



В (2.19) скорость v_1 поступления субстрата Ф6Ф считается величиной постоянной, зависящей лишь от избыточной концентрации глюкозы во внешней среде. На участке Ф6Ф \rightarrow ФДФ скорость $v_2 = kx$ превращения $x \rightarrow y$ должна зависеть не только от x , но и от величины y из-за активации продуктом y фермента ФФК. Математически это можно записать в виде зависимости константы k скорости $v_2 = k_2x$ от y , т. е. $k = k'y$. Тогда $v_2 = kx = k'yx$. Уже на основании этого можно было бы составить простейшую модель для системы (2.19)

$$\frac{dx}{dt} = v_1 - v_2, \quad (2.20)$$

$$\frac{dy}{dt} = v_2 - v_3,$$

имеющую вид

$$\frac{dx}{dt} = v_1 - k'xy, \quad (2.21)$$

$$\frac{dy}{dt} = k'xy - k_2y.$$

Однако легко видеть, что в системе (2.21) при увеличении концентраций x и y субстратов этих реакций скорости v_2 и v_3 растут неограниченно. Между тем хорошо известно, что при увеличении концентрации субстрата скорость нормального биохимического процесса вначале растет, а затем достигает насыщения. Указанная особенность отражает ферментативную природу биохимических процессов. Насыщение скорости есть следствие связывания всех молекул фермента в фермент-субстратный комплекс, после чего увеличение концентрации субстрата уже не оказывает влияния на скорость реакции. Это и описано в известном уравнении Михаэлиса-Ментен (см. лекцию 3), в котором скорость зависит от субстрата как

$$v = \frac{kx}{K_x + x}, \quad (2.22)$$

где k — константа скорости, K_x — константа Михаэлиса.

Видно, что при $x \rightarrow \infty$, $v \rightarrow k = \text{const}$, т. е. при этом насыщается. Нам надо теперь учесть это обстоятельство в системе (2.20), введя аналогичную зависимость скоростей v_2 и v_3 от концентраций реагентов. Тогда окончательно наша модель примет вид

$$\frac{dx}{dt} = v_1 - \frac{k_1x}{K_x + x} \cdot \frac{y}{K_y + y}, \quad (2.23)$$

$$\frac{dy}{dt} = \frac{k_1x}{K_x + x} \cdot \frac{y}{K_y + y} - \frac{k_2y}{K'_y + y},$$

где k_1 , k_2 — константы скоростей, K_x , K_y , K'_y — константы Ми-

хаэлиса. Обратите внимание на появление кубической нелинейности в (2.23) (k_1xy) умножается на (K_x+x) или (K'_y+y) .

Как видно, в (2.23) сам процесс активации также насыщается при бесконечном увеличении концентрации активатора

$y \left(\frac{y}{K_y+y} \right)$. Дальнейшее исследование проводилось при ус-

ловии, что $K_x \gg x$ и $K_y \gg y$. Введем безразмерные переменные $x' = x/\bar{x}$ и $y' = y/\bar{y}$, где \bar{x} и \bar{y} — стационарные концентрации в особой точке ($\dot{x} = \dot{y} = 0$). Характер устойчивости особой точки (\bar{x}, \bar{y}) определяется согласно выражению (2.11). Мы опустим подробные выкладки и перейдем к результату анализа. Оказалось, что характер фазового портрета системы (2.23) меняется в зависимости от соотношения некоторых параметров: α и r . Параметр α обратно пропорционален скорости поступления субстрата процесса гликолиза — глюкозы: $\alpha \sim 1/v_1k_1$, а параметр r равен $r = \bar{y}/K'_y$. Очевидно, параметр α можно рассматривать как управляющий параметр, поскольку его значение можно изменять, варьируя концентрацию глюкозы во внешней среде. Особая точка (\bar{x}, \bar{y}) является устойчивым фокусом, если $\alpha r/(1+r) < 1$, и неустойчивым фокусом, если $\alpha r/(1+r) > 1$. В первом случае в системе происходят только затухающие колебания. Во втором случае в окрестности неустойчивого фокуса возможно образование предельного цикла (рис. 2.13) и система становится автоколебательной. Таким образом, значение пара-

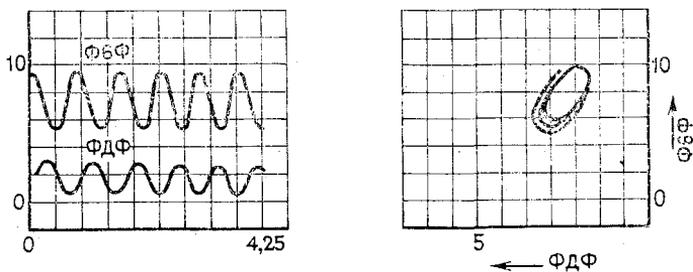


Рис. 2.13. Рассчитанная с помощью ЭВМ кинетика изменений ФДФ и Ф6Ф и фазовый портрет модели гликолиза

метра $\alpha/r(1+r) = 1$ будет бифуркационным. При переходе через точку бифуркации устойчивость особой точки при $\alpha r/(1+r) < 1$ передается предельному циклу — автоколебательному режиму при $\alpha r/(1+r) > 1$. Увеличение параметра α способствует возникновению колебаний, а уменьшение α — их затуханию. Этот результат исследования модели подтверждается экспериментами, в которых понижение скорости подачи глюкозы действительно приводило к возникновению автоколебаний.

Существуют и другие примеры автоколебательных биологических процессов, для которых разработаны соответствующие математические модели и найдены области значений параметров, определяющих возникновение автоколебательного режима. Одним из наиболее интересных биологических периодических процессов являются суточные ритмы, или биологические часы. Цикличность здесь определяется автоколебательными биохимическими реакциями, в которых происходят периодические изменения концентраций некоторых биологически активных веществ. Суточные изменения интенсивности фотосинтеза длительное время наблюдаются даже в условиях непрерывной освещенности. Модель описывает реакции в цикле Кальвина между трехуглеродистыми и шестиуглеродистыми сахарами и обладает предельным циклом. Другие примеры колебаний в ферментативных процессах мы рассмотрим в следующей лекции.

Лекция 3. КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ

Ферментативные процессы играют ключевую роль в клеточном метаболизме, а следовательно, их кинетика должна иметь основное значение в динамике клеточных процессов.

Уравнение Михаэлиса-Ментен. Рассмотрим простейшую ферментативную реакцию, в которой участвуют один субстрат (S) и один фермент (E) и появляется один продукт (P) при распаде фермент-субстратного комплекса (ES):



где k_1 , k_{-1} — константы скоростей прямой и обратной реакций образования (ES), k_2 — константа скорости (v_P) образования продукта P .

Система (3.1) описывается следующими дифференциальными уравнениями:

$$\begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= -k_1(S) \cdot (E) + k_{-1}(ES), \\ \frac{dE}{dt} &= -k_1(S)(E) + k_{-1}(ES) + k_2(ES), \\ \frac{d(ES)}{dt} &= k_1(S)(E) - k_{-1}(ES) - k_2(ES), \\ \frac{dP}{dt} &= k_2(ES) = v_P. \end{aligned} \quad (3.2)$$

Поскольку в системе сохраняется постоянной общая концентрация фермента E_0 , то в любой момент времени сумма концентраций свободного (E) и связанного (ES) фермента равна

$$(E) + (ES) = E_0. \quad (3.3)$$

Посмотрим, можно ли применить в системе (3.1) принцип узкого места или принцип разделения переменных на быстрые и медленные. В уравнениях (3.2) легко выделить две группы переменных. Переменные S и P отражают процессы расходования субстрата и соответствующего появления продукта реакции. Переменные E и ES описывают процессы образования и распада фермент-субстратного комплекса. Посмотрим, насколько отличаются друг от друга эти группы переменных по своим ха-

ракетным временам. Характерное время τ_E существования комплекса (ES) определяется наиболее быстрой стадией его распада с образованием продукта P , т. е. константой скорости v_P образования продукта. Эта же быстрая стадия определяет регенерацию и время существования в системе свободного фермента. Иными словами, характерное время τ_E жизни переменных E и ES составляет

$$\tau_E = 1/k_2. \quad (3.4)$$

Константа k_2 соответствует числу актов катализа, т. е. числу актов распада (ES) и образования P в единицу времени. Время τ_E — это время оборота фермента, а константа k_2 называется числом оборотов фермента. Характерное время τ_S убыли S в системе и соответствующего появления P , очевидно, зависит от скорости образования продукта. Оно равно

$$\tau_S = S/v_P. \quad (3.5)$$

Максимальная скорость образования продукта будет достигнута, когда весь фермент E_0 находится в связанном состоянии, т. е.

$$v_P^{\max} = k_2 E_0.$$

В этих условиях время τ_S убыли S будет минимальным

$$\tau_S^{\min} = \frac{S}{k_2 E_0}. \quad (3.6)$$

Теперь можем сравнить по величине τ_S и τ_E . Очевидно,

$$\tau_S^{\min} = \frac{S}{k_2 E_0}. \quad (3.7)$$

В обычных условиях концентрация субстрата S во много раз превышает концентрацию продукта

$$[E_0] \sim 10^{-6} M, [S] \sim 10^{-2} M.$$

Отсюда следует, что $E_0/S = \varepsilon \sim 10^{-4} \ll 1$, т. е.

$$\tau_S^{\min} = \tau_E \cdot \frac{1}{\varepsilon} \sim \tau_E \cdot 10^4.$$

Обычно по порядку величины $\tau_E \sim 10^{-2}$ с, $\tau_S \sim 10^2$ с, значит,

$$\tau_S \gg \tau_E. \quad (3.8)$$

Но согласно (1.21) это означает, что (E), (ES) являются быстрыми переменными. Их изменения настолько быстры, что они пребывают все время около своих стационарных значений \bar{E} , \bar{ES} . Следовательно, их можно описывать алгебраическими уравнениями, которые получаются путем приравнивания к нулю правых частей второго и третьего уравнений в модели (3.2):

$$\frac{d(E)}{dt} = \frac{d(ES)}{dt} = 0. \quad (3.9)$$

Можно наглядно изобразить полученный результат в двух масштабах времени τ_S и τ_E с помощью рисунка (3.1). Небольшая тележка (E) осуществляет перевоз груза с одного места (S) на другое (P). Она быстро нагружается и разгружается (τ_E мало), возвращаясь вновь за грузом. Однако общий про-

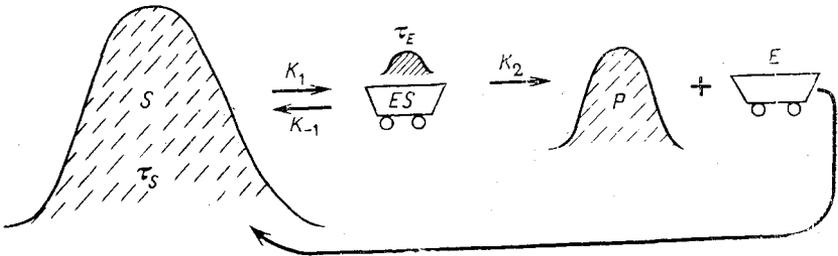


Рис. 3.1. Два масштаба времени ферментативного процесса (объяснения в тексте)

цесс перевозки груза с одного места на другое (убыль S и появление P) происходит намного медленнее, чем каждый отдельный рабочий цикл тележки ($\tau_S \gg \tau_E$). Именно при выполнении условий (3.8) и (3.9) можно получить известное в биохимии уравнение Михаэлиса-Ментен зависимости стационарной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

$$\bar{v}_P = \frac{k_2 E_0 S}{K_M + S}, \quad (3.10)$$

где $K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_1}$ — константа Михаэлиса. Из (3.10) видно,

что при увеличении концентрации субстрата, когда $S \rightarrow \infty$, $\bar{v}_P \rightarrow \bar{v}_P^{\max} = k_2 E_0$, т. е. наблюдается насыщение скорости реакции

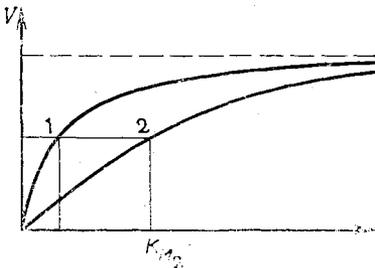


Рис. 3.2. Зависимость скорости (v) ферментативной реакции от концентрации субстрата (S). Кривые 1 и 2 соответствуют двум ферментам с разными контактами Михаэлиса $K_{M_2} < K_{M_1}$

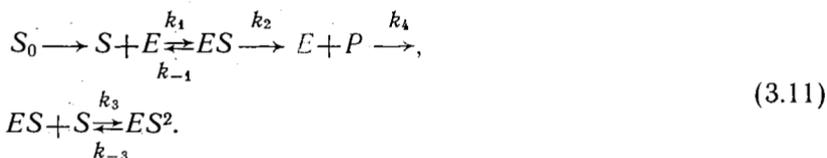
(рис. 3.2). Из (3.10) также видно, что при $K_M = S$ скорость реакции равна $v_P^{\max}/2$. Следовательно, константа Михаэлиса K_M равна численно концентрации субстрата, при которой половина молекул фермента находится в комплексе с субстратом, а стационарная скорость достигает половины своего максимального значения (см. рис. 3.2). Нужная для обеспечения одной и той же скорости v_P концентрация субстрата для двух разных ферментов будет тем больше, чем

меньше активность данного фермента, т. е. чем больше его надо для обеспечения данного количества фермен-субстратных комплексов. Очевидно, способность связываться с субстратом задается в (3.1) константой k_1 , увеличение которой и приводит к росту активности фермента и уменьшению величины K_M .

Регуляция ферментативных реакций. В реальных условиях клеточного метаболизма концентрация субстрата, потребляемого в ферментативных реакциях, изменяется не только в результате самой реакции, но и за счет притока его в реакционный объем. Одновременно происходит и отток продукта из сферы реакции в другие области, где он используется в дальнейших метаболических превращениях. Иными словами, в клетке каждая отдельная ферментативная реакция, так же как и их совокупность, представляет собой открытую систему, обладающую механизмами саморегуляции. Одним из самых мощных способов регуляции ферментативного процесса является изменение активности фермента с помощью различных ингибиторов. Существуют, как известно, конкурентные ингибиторы, занимающие места субстрата в активном центре фермента с образованием неактивного комплекса. Возможно также неконкурентное, или аллостерическое, ингибирование, при котором ингибитор не имеет структурного сродства с субстратом и присоединяется не к активному центру фермента, а к определенным местам белковой глобулы, вызывая деформацию фермента. Регуляторные эффекты могут осуществляться также по принципу обратной связи, когда при больших концентрациях субстрата или продукта угнетается реакция. Наряду с ингибиторами имеются и активаторы — вещества, повышающие активность фермента. Активирующий эффект может оказывать и сам продукт реакции (активация продуктом).

Все эти особенности наряду с нелинейностью кинетики лежат в основе механизмов регуляции ферментативных процессов и в итоге определяют динамическое поведение сложной совокупности метаболических превращений в клетке. Мы увидим, что регуляция даже сравнительно простых ферментативных процессов указанными способами приводит к появлению нетривиальных типов динамического поведения.

Открытая ферментативная система с субстратным угнетением включает необратимую реакцию притока субстрата ($S_0 \xrightarrow{k} S$), оттока продукта ($P \xrightarrow{k_4}$) из сферы реакции и образования неактивного комплекса (ES) + $S \xrightleftharpoons{k_3} (ES^2)$



Скорость v_P образования продукта в схеме (3.11) имеет вид, отличный от стационарного уравнения Михаэлиса-Ментен (3.10), а именно

$$v_P = \frac{k_2 E_0 S}{K_M + S + \frac{S^2}{k_S}}, \quad (3.12)$$

где $k_S = k_3/k_{-3}$.

Заметим, что члены, содержащие S во второй степени (S^2/k), обуславливают сильную нелинейность системы и появление в уравнениях кубических членов (S^3). При малых S ($S \ll 1$), когда величиной S^2/k_S в знаменателе можно пренебречь, уравнения (3.11) и (3.12) совпадают. Однако при росте S образуется уже неактивный комплекс ES^2 и скорость образования продукта $v_P \rightarrow 0$ при $S \rightarrow \infty$. График зависимости $v_P(S)$ имеет вид колоколообразной кривой с максимумом. Скорость изменения субстрата концентрации S складывается из скорости v_S притока его извне $v_{\text{прит}}$

$$v_{\text{прит}} = k(S_0 - S) = \alpha - kS \quad (3.13)$$

и оттока в ходе ферментативной реакции ($v_{\text{отт}} = v_P$):

$$v_S = v_{\text{прит}} - v_P.$$

График зависимости $v_{\text{прит}} = \alpha - kS$ имеет вид прямой линии.

В стационарном состоянии в открытой системе (3.11), когда концентрация субстрата поддерживается постоянной, должно выполняться равенство

$$\bar{v}_{\text{прит}} - \bar{v}_P = 0.$$

Стационарные точки \bar{S} при $\bar{v}_S = 0$ представляют собой точки пересечения кривых $v_P(S)$ и $v_{\text{прит}}(S)$. На рис. 3.3 различным значениям α соответствует семейство параллельных прямых. Изменяя α или внешнюю концентрацию субстрата S_0 , легко видеть, что система может иметь от одного до трех стационарных состояний.

Изменяя значение управляющего параметра α , можно менять число стационарных точек. В интервале $\alpha_2 < \alpha < \alpha_4$ каждому значению α отвечают три различных стационарных состояния системы, а значения α_2 и α_4 , при которых изменяется число стационарных точек, являются бифуркационными.

Стационарные точки отличаются по своей устойчивости. Так, при $\alpha = \alpha_3$ из трех стационарных точек \bar{S}_3' , \bar{S}_3'' и \bar{S}_3''' точка \bar{S}_3'' неустойчива, а \bar{S}_3' и \bar{S}_3''' — устойчивы. В этом легко убедиться, проведя анализ на устойчивость (см. рис. 1.4). В самом деле, пусть в результате некоторого отклонения $\Delta S < 0$ от стационарной точки \bar{S}_3' величина S стала меньше стационарного значения \bar{S}_3' . В области $S < \bar{S}_3'$ скорость притока субстрата больше

скорости его оттока ($v_{\text{прит}} > v_P$) и, следовательно, переменная S будет расти, вновь приближаясь к \bar{S}_3' . Если же отклонение от стационарной точки $\Delta S > 0$, т. е. $S > \bar{S}_3'$, то в этой области $v_{\text{прит}} < v_P$ и S будет уменьшаться, возвращаясь к стационарному значению \bar{S}_3' . Таким образом, при любом отклонении от

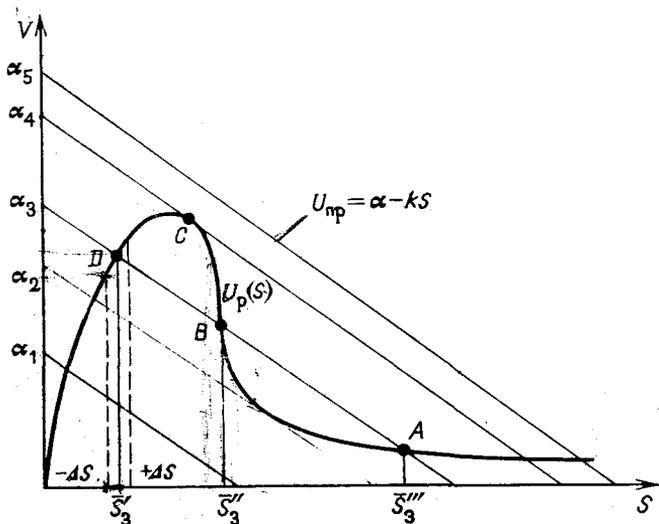


Рис. 3.3. Зависимость числа стационарных состояний от значений параметра α и их устойчивость в системе с субстратным угнетением и обратимым притоком субстрата

стационарного состояния \bar{S}_3' система будет в него возвращаться и, следовательно, состояние \bar{S}_3' устойчиво. Аналогичные рассуждения показывают, что точка \bar{S}_3'' неустойчива, а \bar{S}_3''' — устойчива. Устойчивые точки расположены на кривой $v_P(S)$ на участках AB и CD , а неустойчивые — на участке BC . Можно построить график $\bar{S}(\alpha)$ зависимости стационарных состояний от величины управляющего параметра α . Из рис. 3.4 видно, как при изменении α система может переключаться из одного устойчивого режима в другой.

Предположим, что в исходном состоянии система находится в точке A на верхней ветви кривой $\bar{S}(\alpha)$. При снижении скорости притока и уменьшении α система будет «перемещаться» влево вдоль верхней устойчивой ветви AB стационарных состояний. При достижении бифуркационного значения параметра α_2 система покинет неустойчивую точку B и совершит скачкообразный переход $B \rightarrow D$ на нижнюю ветвь устойчивых стационар-

ных состояний. Увеличивая вновь значение параметра от α_2 до α_1 , можно перевести систему вдоль устойчивой ветви DC до бифуркационной точки C . После достижения этой точки система скачкообразно вернется в исходное состояние на верхнюю ветвь AB .

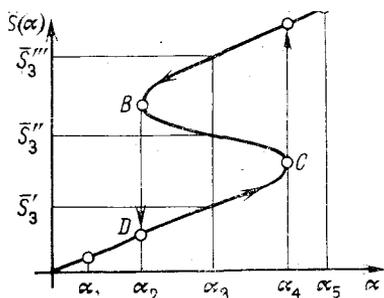


Рис. 3.4. Кривая стационарных состояний $\bar{S}(\alpha)$ в системе с субстратным угнетением и обратимым притоком субстрата

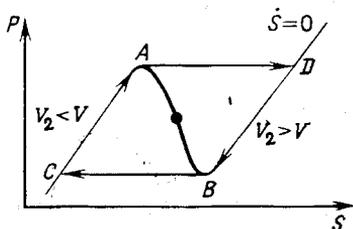


Рис. 3.5. Предельный цикл на фазовой плоскости системы (3.14) при малой глубине продуктного угнетения

Таким образом, наша система может функционировать в одном из двух устойчивых стационарных состояний и, следовательно, она обладает триггерными свойствами. Направление переходов и реализация одного или другого устойчивого состояния зависит от того, происходит уменьшение или увеличение параметра. Это свойство системы — совершать различными путями переход из одного состояния в другое в зависимости от предыдущего увеличения ($DC \rightarrow AB$) или уменьшения ($AB \rightarrow DC$) параметра или от предыстории системы — называется гистерезисом. Периодическое движение вдоль гистерезисного цикла $A \rightarrow B \rightarrow D \rightarrow C \rightarrow A$ носит колебательный характер.

Сильная нелинейность, обусловленная механизмами субстратного угнетения, а также наличие быстрых и медленных переменных служат причиной появления в системе множественных стационарных состояний и триггерных и гистерезисных свойств.

Колебания в ферментативных системах обусловлены аналогичными причинами. Поскольку в ферментативных системах обычно концентрация субстрата намного превышает концентрацию фермента, то это создает условие существования двух сильно различающихся масштабов времени для субстрата и ферментсодержащих комплексов. Для незатухающих колебаний непременным условием является открытый характер системы, поскольку в замкнутых ферментативных системах наблюдаются лишь затухающие колебания.

Наиболее распространенная причина нелинейности биохимических систем связана с наличием обратных связей в цепи реакций, когда продукт угнетает или активирует реакцию, а также при условии субстратного угнетения. Эти факторы оказывают сильное дестабилизирующее действие на системы, способствуя появлению в ней неустойчивой особой точки, около которой может образовываться предельный цикл. Условием устойчивого автоколебательного режима является наличие неустойчивости в системе.

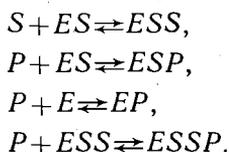
Рассмотрим схему реакции с субстратным и продуктным угнетением



Изменение концентраций медленных переменных продукта и субстрата описывается уравнениями

$$\begin{aligned}
 \frac{dS}{dt} &= v_1 - v(S, P), \\
 \frac{dP}{dt} &= v(S, P) - v_2.
 \end{aligned}
 \quad (3.15)$$

Заметим, что S, P должны быть представлены в виде безразмерных величин $(S/\bar{S}, P/\bar{P})$. Однако для простоты мы везде опускаем операцию введения безразмерных переменных. В этой системе угнетение происходит в результате неконкурентного ингибирования продуктом и субстратом по схеме

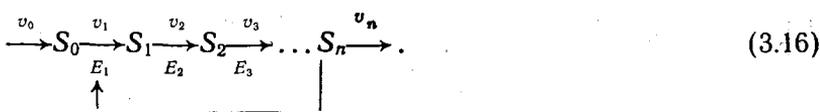


В случае, когда реакция притока субстрата обратима, отток продукта линейный. Зависимость $v(S)$ носит вид колоколообразной кривой с максимумом.

Анализ показывает, что число стационарных состояний системы и их устойчивость зависят от глубины продуктного угнетения. При слабом угнетении продуктом относительная концентрация субстрата будет быстрой переменной по сравнению с концентрацией продукта. При этом в системе реализуется единственное стационарное неустойчивое состояние, расположенное на неустойчивой части характеристики $v(S)$. В системе возникают автоколебания вокруг неустойчивого состояния на фазовой плоскости S, P (рис. 3.5) при движении ее вдоль цикла $C \rightarrow A \rightarrow D \rightarrow B \rightarrow C$. Точки A и B лежат на границах устойчивых (AC и DB) и неустойчивой (AB) ветвей квазистационарной кривой ($\dot{S}=0$). Движение по ветви CA совершается по направлению к точке A ($C \rightarrow A$) с накоплением продукта, так как в

области CA скорость v_2 оттока продукта меньше скорости его образования. В критической точке A при $v=v_2$ система теряет устойчивость и скачком переходит в точку D ветви DB , на которой скорость оттока v_2 становится больше скорости реакции. Вследствие этого концентрация продукта начинает вновь убывать, а скорость v растет. Достигнув точки $B(v=v_2)$, система вновь теряет устойчивость и «срывается» в быстрое движение по направлению к исходной точке C . Далее цикл повторяется, а система совершает автоколебания.

Общие условия возникновения колебаний в ферментативных реакциях предполагают наличие большого числа промежуточных стадий в открытой цепи. Анализ показал, что это реализуется в полиферментных кольцевых системах, где конечный продукт влияет на скорость начальной стадии. Эти системы называются кольцевыми



Стрелка обратной связи показывает угнетающее влияние конечного продукта на активность ключевого фермента E_1 .

Нелинейная кинетика, регуляция по принципу обратной связи, иерархия характерных времен, изменения переменных определяют различные типы динамического поведения биологических процессов. Отличные по своей природе биологические процессы характеризуются тем не менее близкими динамическими свойствами, топологически сходными фазовыми портретами и их зависимостями от управляющих параметров. На основании этого возможно разработать классификации биохимических систем по типам их динамического поведения. Например, несколько типовых математических моделей, аналогичных по своей структуре схеме (3.14), к которым можно свести различные кинетические схемы для сравнительного изучения параметрических характеристик их динамического поведения.

Лекция 4. РАСПРЕДЕЛЕННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ

Рассмотрим модели, где переменные изменяются не только во времени, но и в пространстве. В отличие от точечных такие модели называются распределенными (в пространстве). В распределенных системах могут протекать в отдельных точках пространства химические превращения веществ и одновременно происходить диффузия отдельных веществ из элементарных объемов с высокой концентрацией в объемы с меньшей концентрацией. Таким образом, связь между соседними элементарными объемами осуществляется за счет процессов переноса. В биологических системах (активные мембраны, ткани, сообщества организмов) также существуют и распределенные источники энергии. Часть этой энергии диссипирует в элементарных объемах системы. Такие системы относятся к активным распределенным системам.

Примером биологического процесса, протекающего в распределенной системе, служит образование структур в морфогенезе. Оно происходит не за счет внешних толчков, а самопроизвольно на основе информации, заключенной в оплодотворенной яйцеклетке, в исходно пространственно однородной среде. Речь идет в данном случае о возникновении в активной распределенной системе стационарных пространственно неоднородных структур. Другой пример — распространение волн возбуждения в нервной или мышечной ткани.

Уравнение для распределенной системы. Исследование простейших моделей показало, что различные типы поведения активных распределенных систем могут быть описаны нелинейными дифференциальными уравнениями в частных производных, где учитываются химические реакции и диффузия реагентов.

Рассмотрим простейший случай одной переменной x , которая участвует в химическом процессе и одновременно диффундирует вдоль узкой трубки (рис. 4.1). Диффузный поток вещества (т. е. масса, проходящая в единицу времени через единицу площади, перпендикулярной к направлению диффузии) пропорционален градиенту концентрации этого вещества, взятому с обратным знаком

$$I = -D \frac{\partial c(r, t)}{\partial r}, \quad (4.1)$$

где D — коэффициент диффузии.

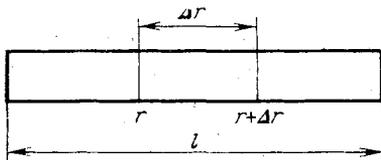


Рисунок. Распределенная система с одной переменной x , участвующей в химическом процессе и диффундирующей вдоль узкой трубки

Можно показать, что изменение концентрации вещества во времени за счет процессов диффузии в элементарном объеме трубки, заключенном между точками r и $r + \Delta r$, зависит от разности потоков I в точках r и $r + \Delta r$ и в пределе при $\Delta r \rightarrow 0$ равно

$$\frac{\partial c}{\partial t} = - \frac{\partial I}{\partial r} = \frac{\partial}{\partial r} \left(D \frac{\partial c(r, t)}{\partial r} \right)$$

Если коэффициент диффузии D постоянен, то уравнение диффузии имеет вид

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c(r, t)}{\partial r^2} \quad (4.2)$$

Уравнение (4.2) описывает изменение во времени концентрации вещества, когда в системе происходит только диффузия. Однако кроме диффузии происходят и химические реакции, которым в простейшем случае соответствуют «точечные» члены $f(c)$. Общее уравнение для изменения « c » за счет химической реакции и диффузии имеет вид

$$\frac{\partial c}{\partial t} = f(c) + D \frac{\partial^2 c}{\partial r^2} \quad (4.3)$$

Если в системе имеется несколько веществ $c_1, c_2, \dots, c_3, \dots, c_n$, то вместо (4.3) надо записать

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = f_i(c_1, c_2, \dots, c_n) + D_i \frac{\partial^2 c_i}{\partial r^2}, \quad i = 1, 2, \dots, n. \quad (4.4)$$

Исследование моделей распределенных систем представляет собой трудную задачу, на которой мы остановимся лишь в самых общих чертах. Для решения систем обыкновенных дифференциальных уравнений (точечных моделей) необходимо было задать начальные значения переменных в начальный момент времени $t = t_0$. В случае распределенных систем следует задать также краевые или граничные условия на границе области, в пределах которой протекает изучаемый процесс. Краевые условия зависят от того, каким образом изменяются концентрации

вещества на границе. Например, на краю трубки может быть задана постоянная концентрация вещества в резервуаре, с которым трубка находится в контакте, или, наоборот, торцы трубки непроницаемы для диффузионного потока.

Заметим, что распределенную систему (4.4) можно свести к точечной

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = f(c_1, c_2, \dots, c_n); \quad i = 1, 2, \dots, n,$$

если все коэффициенты диффузии $D_i = 0$ или если, наоборот, они очень велики, так что все исходные реагенты и продукты успевают полностью перемешиваться во всем реакционном объеме во время химической реакции. Стационарные точки надо искать из условий равенства нулю производных во времени $\frac{\partial c_i}{\partial t} = 0$:

$$D_i \frac{d^2 c_i(r, t)}{dr^2} + f_i(c_1, c_2, \dots, c_n) = 0, \quad (4.5)$$

откуда можно найти стационарные значения $\bar{c}_i(r)$. Затем задается некоторое возмущение $\Delta c_i(r)$ и исследуется поведение его во времени. Если со временем при $t \rightarrow \infty$ внесенное небольшое возмущение $\Delta c_i(r)$ не нарастает в системе, то исходная стационарная точка $\bar{c}_i(r)$ была устойчивой. Поведение начального отклонения зависит от свойств функций $f_i(c_1, c_2, \dots, c_n)$ и значений коэффициентов диффузии. В частности, для одномерной задачи при $f'_c(\bar{c}) < 0$ начальное отклонение со временем будет затухать при $t \rightarrow \infty$ (ср. (1.13) — (1.14)).

Базовые модели. При помощи одного уравнения нельзя описать сложное поведение переменных, например колебательное состояние системы. Основные результаты в исследовании свойств распределенных систем получены на так называемых «базовых моделях» с двумя переменными (ср. (2.1)):

$$\begin{aligned} \frac{\partial x}{\partial t} &= P(x, y) + D_x \frac{\partial^2 x}{\partial r^2}, \\ \frac{\partial y}{\partial t} &= Q(x, y) + D_y \frac{\partial^2 y}{\partial r^2}. \end{aligned} \quad (4.6)$$

Оказалось, что эта простая модель типа (4.6) может качественно описать процессы самопроизвольного возникновения воли и структур в распределенных системах, т. е. процессы самоорганизации. Они осуществляются, когда в системе возникают неустойчивости, приводящие к потере исходного распределения веществ во времени и пространстве. Вместо этого устанавливается новый тип распределения вещества во времени и пространстве, т. е. происходит самоорганизация системы. Например, потеря устойчивости стационарного пространственно однородного распределения веществ в химической реакции может привести к тому,

что вместо него в системе появятся автоволны — периодические самоподдерживающиеся волны химической активности.

В зависимости от вида функций $f_i(c_1, c_2, \dots, c_n)$ и коэффициентов диффузии D_i в системах могут возникать следующие нетривиальные типы поведения переменных или виды самоорганизации.

1. Распространяющиеся возмущения в виде бегущего импульса.

2. Стоячие волны.

3. Синхронные автоколебания разных элементов во всем пространстве.

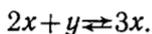
4. Квазистохастические волны, которые получаются при случайном возмущении разности фаз автоколебаний в двух точках пространства.

5. Стационарные неоднородные распределения переменных в пространстве — диссипативные структуры.

6. Генерация волн автономными источниками импульсной активности. В качестве источников волн могут быть, например, локальные кратковременные флуктуации переменных.

Общим условием развития процессов самоорганизации является появление неустойчивости в исходной распределенной системе. В частности, появление неустойчивости типа седла вызывает появление диссипативных структур, а появление неустойчивого узла может вызвать возникновение бегущих волн конечной амплитуды или стоячих волн. Диссипативная структура, возникающая в результате неустойчивости в распределенной системе, поддерживается за счет постоянного притока энергии и вещества и может наблюдаться только в открытых системах. В этом ее отличие от обычных равновесных структур. Образование такого рода диссипативных структур лежит в основе дифференцировки тканей при морфогенезе. Скачкообразный переход между диссипативными структурами различной формы, который индуцируется при увеличении длины реакционного сосуда, отражает принципиальную особенность процесса деления клетки.

Брюсселятор представляет собой наиболее исследованную систему, которая при разных значениях параметров может обладать разнообразным поведением во времени и пространстве. На модели брюсселятора удается выявить условия возникновения типов самоорганизации в биологических и химических системах, и в этом смысле эта модель является базовой. Обратим внимание на то, что в брюсселяторе содержится простейшая кубическая нелинейность, которая обеспечивается реакцией



Примером такой реакции может быть ферментативный процесс, в котором фермент имеет по крайней мере три каталитических центра. Кубическая нелинейность — важное условие возникновения диссипативных структур.

Брюсселятор представляет собой следующую схему гипотетических химических реакций:



где A, B — исходно заданные вещества, распределенные в трубке равномерно, и их запас велик; вещества R и C выпадают в виде осадка. Переменные x и y диффундируют вдоль трубки и участвуют в химическом процессе.

Модель брюсселятора имеет вид

$$\begin{aligned} \frac{\partial x}{\partial t} &= A + x^2 y - (B+1)x + D_x \frac{\partial^2 x}{\partial r^2}, \\ \frac{\partial y}{\partial t} &= Bx - x^2 y + D_y \frac{\partial^2 y}{\partial r^2}. \end{aligned} \quad (4.8)$$

Приведем результаты исследования типов поведения модели (4.8) в зависимости от соотношений параметров (A, B, D_x, D_y). Точечная модель ($D_x = D_y = 0$) обладает стационарной точкой

$$\bar{x} = A, \quad \bar{y} = B/A. \quad (4.9)$$

При $B < 1 + A^2$ эта точка представляет собой устойчивый фокус, а при $B > 1 + A^2$ — неустойчивый фокус, вокруг которого в точечной системе образуется предельный цикл.

В распределенной системе (4.8) возможно появление неустойчивости седлового типа, которая приводит к развитию возмущений в пространственно однородной системе и установлению в ней пространственно неоднородных стационарных режимов. При определенных размерах трубки и длинах волн, определяющих характер неоднородностей или изрезанности пространства, в системе возможно возникновение периодических диссипативных структур, не зависящих от времени. Для их появления необходимо, чтобы коэффициенты D_x и D_y были существенно различны, а параметры A и B не слишком далеки от своих бифуркационных значений. Кроме того, в брюсселяторе возможны также и автоволновые процессы типа стоячей и бегущей волны. Непрерывное изменение параметров приводит к тому, что одни диссипативные структуры сменяют другие. Таким образом, брюсселятор является распределенным триггером со многими устойчивыми состояниями — формами диссипативных структур.

На основании базовой модели процесс деления клеток можно связать с параметрически заданным образованием новой диссипативной структуры, возвращение из которой невозможно в силу гистерезиса.

Говорят, что образование диссипативных структур определяется динамическим считыванием параметрически заданной информации. Волновые процессы можно наблюдать и в прямых

экспериментах на примере окислительно-восстановительной реакции Белоусова—Жаботинского с участием броммалоновой кислоты с катализаторами—ионами церия или марганца. Эти процессы также описываются уравнениями базового типа (4.8).

Ниже (лекция 5) мы рассмотрим модели образования диссипативных структур в экологических системах.

Лекция 5. МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ В ЭКОЛОГИИ

Решение современных экологических проблем имеет не только важное научное, но и общее значение для жизни человечества. Особую роль здесь приобретает изучение динамики **экологических процессов**, направленное на разработку методов прогнозирования развития экологических систем и их оптимального управления в интересах человека. Одним из важных путей в этом направлении является математическое моделирование процессов энерго- и массообмена в биогеоценозе, в которые вовлекаются биомассы звеньев экологических систем.

Мы рассмотрим основные модели динамики численности популяций в экосистемах, увидим каким образом на их основе можно характеризовать устойчивость экологических сообществ и прогнозировать их поведение во времени.

Модели отдельной популяции. Рассмотрим поведение отдельно взятой популяции, не учитывая в явном виде ее взаимодействия с другими видами, находящимися с ней либо на одном, либо на других трофических уровнях. Простейшие уравнения, описывающие неограниченный рост популяции в условиях избытка пищи и места (например, пенициллиновых грибков в культиваторе), уже были рассмотрены в лекции 1 (1.1) — (1.3).

Напомним, что уравнение (1.3) логистической кривой Ферхюльста получается при учете самоограничения роста («самоуправления») популяции в условиях тесноты и конкуренции внутри популяции. Оно имеет вид

$$\frac{dx}{dt} = \epsilon x - \delta x^2, \quad (5.1)$$

где член δx^2 , пропорциональный количеству встреч между особями внутри популяции, учитывает этот эффект самоограничения роста.

Легко видеть, что уравнение стационарных состояний

$$\epsilon \bar{x} - \delta \bar{x}^2 = 0$$

имеет два корня:

$$\bar{x}_1 = 0,$$

$$\bar{x}_2 = \frac{\epsilon}{\delta}.$$

Согласно критерию устойчивости (1.17) знак производной правой части (5.1)

$$f'(x) = \varepsilon - 2\delta x \quad (5.2)$$

в стационарной точке определяет ее устойчивость. Подставив значение $\bar{x}_1 = 0$, для первого стационарного режима получим, что $f'_{\bar{x}_1=0}(x) = \varepsilon > 0$, т. е. состояние, где $\bar{x}_1 = 0$ неустойчиво.

Наоборот, другое стационарное состояние $\bar{x}_2 = \frac{\varepsilon}{\delta}$ устойчиво, так как всегда

$$f'_{\bar{x}_2}(x) = -\varepsilon < 0.$$

Устойчивое состояние $\bar{x}_2 = \varepsilon/\delta = \bar{x}_{\max}$ соответствует максимальной стационарной численности популяции, или «емкости среды», возможной в данных условиях. Как видно, величина зависит от соотношения констант ε и δ процессов «притока» и «убыли» численности популяции. Уравнение (5.1) удобно переписать в виде

$$\dot{x} = rx(1 - x/k), \quad (5.3)$$

где $r = \varepsilon$, $k = \frac{\varepsilon}{\delta}$.

Уравнение (5.3) является простой математической моделью, изучая свойства которой мы уже можем понять влияние некоторых факторов на судьбу популяции.

Как видно из (5.1) и (5.3), увеличение численности x зависит от скорости размножения популяции как εx . Между тем это линейное выражение справедливо лишь для бесполового размножения. Для разнополой популяции в условиях неограниченных ресурсов скорость размножения определяется числом встреч самцов и самок и квадратично растет с ростом числа особей

$$\dot{x} = rx^2. \quad (5.4)$$

Однако когда плотность популяции очень велика, то скорость размножения лимитируется уже не числом встреч самцов и самок, а числом самок в популяции. Оба эффекта — квадратичная зависимость скорости размножения и ее некоторое ограничение при больших плотностях — учитывается, как

$$\dot{x} = a \frac{\beta x^2}{\beta + \tau x}. \quad (5.5)$$

Формула (5.5) не дает предела роста численности популяции и не предсказывает ее гибели при низких плотностях численности. Но в реальных условиях экологи наблюдают вымирание популяции, если численность ее опускается ниже некоторой критической величины. Очевидно, это связано с тем, что при низких плотностях популяции время, необходимое для встречи и оплодотворения, становится уже больше времени жизни отдельной особи, способной к оплодотворению. Учтем

этот фактор, введя в (5.5) член, описывающий смертность, пропорциональную численности:

$$\dot{x} = a \frac{\beta x^2}{\beta + \tau x} - \gamma x. \quad (5.6)$$

Это уравнение имеет два стационарных решения

$$\bar{x}_1 = 0, \quad \bar{x}_2 = \frac{\gamma \beta}{a \beta - \gamma \tau} = l. \quad (5.7)$$

Анализ показывает, что точка $\bar{x}_1 = 0$ устойчива, а точка $\bar{x}_2 = l$ неустойчива. Это надо понимать следующим образом. Если начальная численность популяции меньше l ($x < l$), то популяция вырождается и ее численность стремится к нулю ($x \rightarrow 0$). Однако при $x > l$ согласно (5.6) популяция будет расти неограниченно. Для прогнозирования жизни популяции конкретного вида очень важно знать значение нижней критической величины ее численности, ниже которой популяция неизбежно вымирает. Оказалось, например, что популяция голубых китов обречена на вымирание, ибо ее плотность сейчас ниже критической величины. И это несмотря на то, что отдельные особи встречаются в Мировом океане, а охота на голубых китов запрещена. Ясно также, что реальная численность популяции должна быть ограничена и сверху, так как при больших плотностях скорость размножения падает (член δx^2 в 5.1) из-за внутривидовой конкуренции. Выражение, учитывающее оба фактора — нижнюю критическую границу численности и самоограничение при больших плотностях, — имеет вид

$$\dot{x} = a \frac{\beta x^2}{\beta + \tau x} - \gamma x - \sigma x^2. \quad (5.8)$$

На рис. (5.1) показаны графики зависимости численности от времени (а) и скорости $\dot{x}(t)$ от численности $x(t)$ (б). Система

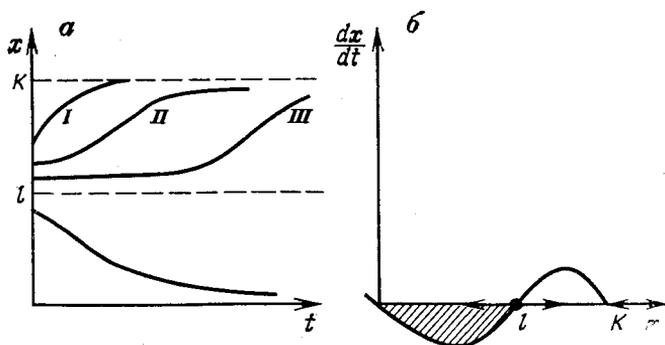


Рис. 5.1. Зависимость численности популяции от времени (а) и скорости роста от численности (б) в соответствии с формулой (5.8). Штриховкой обозначена область вырождения популяции

(5.8) имеет уже три стационарные точки (вследствие появления в стационарном уравнении кубичных членов $(-\tau \delta x^3)$): $\bar{x}_1=0$ и $\bar{x}_3=K$ — устойчивые точки и $\bar{x}_2=l$ — неустойчивая точка, расположенная на границе областей двух устойчивых режимов (K и l — функции параметров уравнения 5.8). В зависимости от начальной численности популяция либо вымирает: $x \rightarrow 0$ при $x_{\text{нач}} < l$, либо достигает максимально возможного значения своей численности ($x \rightarrow K$) при $x_{\text{нач}} > l$.

Конечно, пытаясь предсказать судьбу конкретной популяции, необходимо заранее знать не только ее начальную численность, но и определить путем наблюдений и экспериментов величины l и K . В ряде случаев удается предвидеть приближение популяции к опасной границе, ниже которой восстановление численности уже невозможно, что особенно важно при планировании промыслов. Если в ответ на одноразовое сокращение численности развитой популяции ее восстановление происходит быстро (кривая 1 рис. 5.1), без начального запаздывания, то критическая точка ($\bar{x}=l$) еще далеко. И наоборот, появление лаг-фазы в восстановительном процессе (кривая 3 рис. 5.1) говорит об опасной близости к границе необратимого сокращения численности и, следовательно, о необходимости сократить масштабы промысла.

Влияние запаздывания. В реальных экосистемах процессы размножения и гибели происходят в разные моменты времени. Это означает, что в уравнениях скорость изменения численности популяции должна зависеть от величины численности не в тот же, а в предыдущий момент времени. Иными словами, отклик системы на изменение величин ее переменных происходит не сразу, а через некий временной интервал T (запаздывание). В экосистемах это связано прежде всего с периодом вынашивания плода и развития особи. Если время развития взрослой особи составляет T , то уравнение, описывающее в общем виде динамику численности взрослых особей:

$$\dot{x} = f(x),$$

следует заменить уравнением

$$\dot{x} = f(x_{t-T}), \quad (5.9)$$

где x_{t-T} — численность половозрелых особей в момент времени $t-T$.

Другой эффект запаздывания в регуляции численности связан с сезонным характером размножения многих видов. В случае, когда взрослые особи, размножающиеся в данном году, не доживают до того, чтобы размножиться в следующем году, уравнение с «годовым» запаздыванием примет вид

$$\dot{x}_{n+1} = f(x_n),$$

где n — численность популяции в году n .

Самоограничение численности популяции, учтенное в (5.1)

в виде квадратичного члена ($-\delta x^2$), осуществляется в результате отравления среды продуктами метаболизма, каннибализма. Эти факторы зависят прежде всего от численности взрослых особей, а воздействуют они наиболее сильно на ранние возрастные стадии. Это также значит, что ограничение общей численности x в данный момент определяется влиянием на популяцию особей в предыдущий момент. С учетом этих явлений логистическое уравнение роста (5.1) переписывается в виде

$$\dot{x} = \varepsilon x - \delta x x_{t-T} = x(\varepsilon - \delta x_{t-T}), \quad (5.11)$$

или вместо уравнения роста (5.3) получим известное в математической экологии уравнение Хатчинсона

$$\dot{x} = rx \left(1 - \frac{x_{t-T}}{K} \right), \quad (5.12)$$

где T — возраст половой зрелости.

Решение уравнений с запаздыванием раскрывает разнообразие динамических режимов в экосистемах и, в частности, показывает условия возникновения колебаний численности. Общая причина возникновения колебаний здесь та же, что и в системе, регулируемой петлей обратной связи, в которой происходит существенная задержка «ограничительного сигнала». Это и имеет место в популяции, где самоограничение численности x в данный момент t происходит с задержкой T во времени за счет жизнедеятельности взрослых особей в предыдущий момент $t-T$. Это особенно проявляется в системах, где продолжительность задержки в петле обратной связи превышает собственное характерное время системы. В экосистемах (5.11) — (5.12) при $T \gg 1/\varepsilon$ ($1/\varepsilon$ — собственное время системы) могут возникнуть нарастающие колебания, хотя уравнение без запаздывания никаких колебаний численности не дает (см. рис. 5.1). В зависимости от параметров колебания могут носить регулярный периодический или, наоборот, хаотический характер, при котором частота и амплитуда не постоянны. Таким свойством обладают некоторые модельные и лабораторные экосистемы.

На рис. (5.2) приведена экспериментальная кривая колебания численности мух и личинок в популяционном ящике. Исследование соответствующей модели (рис. 5.3) показало, что для возникновения неустойчивости и нарастающих колебаний необходимо, чтобы время развития от яйца до взрослой особи (запаздывание) было больше, чем время естественной смертности ($T > \frac{1}{\varepsilon}$). В других моделях хаотических колебаний было установлено, что амплитуда очередной вспышки численности прямо пропорциональна интервалу между вспышками (регулярный хаос). Возможно, существование сверхвспышек насекомых в природе указывает на то, что динамический режим таких популяций — «регулярный хаос».

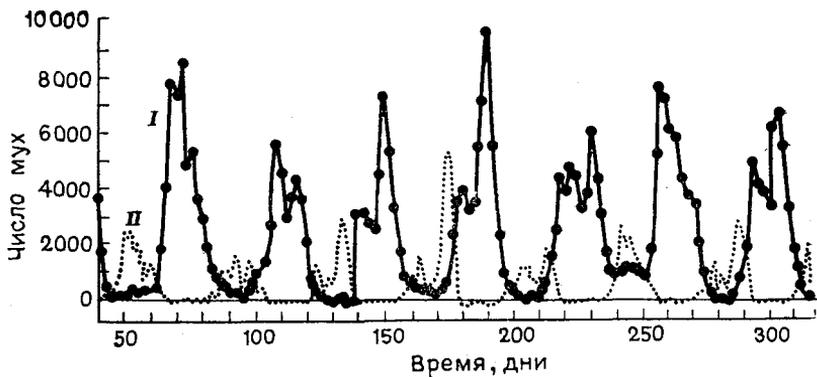


Рис. 5.2. Численность мух *Lucilia C.* в популяционном ящике (Nicolson, 1954): I — число взрослых особей; II — число яиц, откладываемых за день

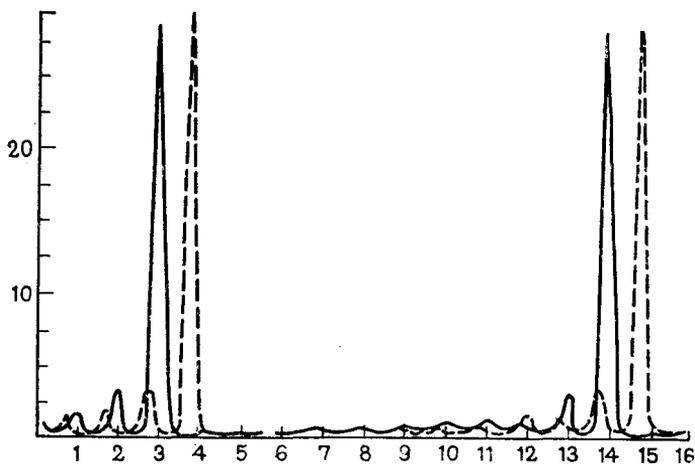


Рис. 5.3. Динамика численности в модели личинки-имаго с запаздыванием: квазистохастическое поведение

Модели взаимодействия видов. Огромное разнообразие способов взаимодействия видов делает, казалось бы, невозможным построение общих моделей, в которых бы отражались закономерности роста популяций в природе. Однако в зависимости от того, увеличивается или остается неизменной численность популяции одного вида в присутствии другого можно классифицировать взаимодействия, не вдаваясь в детали их механизмов. Соответственно этому подходу модели взаимодействий видов могут быть трех типов:

1) конкуренция видов, ведущая к уменьшению численности обоих видов;

2) взаимодействия типа хищник — жертва, когда увеличение численности хищника (или паразита) происходит за счет уменьшения численности жертвы (хозяина);

3) симбиоз, ведущий к увеличению численности обоих видов.

Предположим, как это было сделано на примере модели Вольфелла хищник — жертва, что изменение численности (биомассы) одного из двух видов пропорционально вероятности встреч их особей, т. е. произведению их численностей. Тогда можно написать уравнения, описывающие взаимодействия видов с численностью каждого x_1 и x_2 соответственно:

$$\begin{aligned}\dot{x}_1 &= c_1 x_1 - a_{11} x_1^2 + a_{12} x_1 x_2, \\ \dot{x}_2 &= c_2 x_2 + a_{21} x_1 x_2 - a_{22} x_2^2.\end{aligned}\tag{5.13}$$

В этих уравнениях аналогично (5.1) линейные члены $c_1 x_1$ и $c_2 x_2$ описывают свободное размножение видов, а члены $(-a_{11} x_1^2)$ и $(-a_{22} x_2^2)$ соответствуют самоограничению роста их популяций. Появление членов $a_{12} x_1 x_2$ и $a_{21} x_1 x_2$ вызвано взаимодействием видов, характер которого учитывается знаком коэффициентов. Если виды конкурируют, то коэффициенты отрицательны $a_{12} < 0$, $a_{21} < 0$. При симбиозе оба коэффициента положительны $a_{12} > 0$, $a_{21} > 0$. В случае отношений хищник — жертва коэффициенты a_{12} и a_{21} имеют разные знаки.

Анализ системы (5.13) на устойчивость проводится с учетом значений и знаков коэффициентов в уравнениях. Мы ограничимся рассмотрением некоторых основных результатов. В случае конкуренции уравнения (5.13) примут вид

$$\begin{aligned}\dot{x}_1 &= x_1 (c_1 - a_{11} x_1 - a_{12} x_2), \\ \dot{x}_2 &= x_2 (c_2 - a_{21} x_1 - a_{22} x_2).\end{aligned}\tag{5.14}$$

Приравняв к нулю правые части, найдем, что система (5.14) обладает четырьмя стационарными точками, характер устойчивости которых может меняться в зависимости от значений коэффициентов. Анализ показывает, что только одна точка соответствует устойчивому существованию двух видов при условии справедливости соотношения между коэффициентами

$$a_{12} a_{21} < a_{11} a_{22}.\tag{5.15}$$

Во всех остальных случаях точки либо неустойчивы, либо устойчивые режимы наблюдаются лишь при нулевой численности одного из видов, т. е. когда выживает только один вид.

Неравенство (5.15) означает, что конкурирующие виды могут сосуществовать в устойчивой системе, если произведение коэффициентов межпопуляционного взаимодействия $a_{12} a_{21}$ меньше, чем произведение коэффициентов внутривидового взаимодействия

«самоограничительного» взаимодействия a_{11} , a_{22} . Это можно интерпретировать таким образом, что подавление численности одного из конкурентов происходит в большей степени за счет самоограничения при его собственном росте, чем за счет роста другого конкурента. Иными словами, чрезмерно разросшаяся популяция сама ограничивает свой рост, давая тем самым возможность существованию соседней популяции конкурентов. Естественно, это может наблюдаться в относительно благоприятных условиях. В суровых же условиях, где ресурсов не хватает и «все силы идут на борьбу с соперником», рост популяций ограничен и коэффициенты a_{11} , a_{22} малы по сравнению с a_{12} , a_{21} . Тогда неравенство (5.15) нарушается и устойчивый режим становится возможным лишь при выживании одного самого сильного конкурента. Отношения видов типа хищник — жертва уже рассматривались нами на примере модели Вольтерра (см. гл. 2), где было показано, что в зависимости от соотношения параметров особая точка системы (5.16)

$$\begin{aligned} \dot{x}_1 &= x_1(c_1 - a_{11}x_1 - a_{12}x_2), \\ \dot{x}_2 &= x_2(c_2 + a_{21}x_1 - a_{22}x_2) \end{aligned} \quad (5.16)$$

может быть либо устойчивым узлом (при больших a_{11} , a_{22}), либо устойчивым фокусом. В частном случае, когда коэффициенты $a_{11}=0$, $a_{22}=0$, система обладает особой точкой типа центр (см. рис. 2.8, 2.9). В этом случае модель становится негрубой и не дает устойчивых незатухающих колебаний, поскольку при любой случайной флуктуации численности система переходит с одной эллипсоидальной траектории на другую с изменением амплитуды колебаний. Однако в природе и в экспериментальных условиях наблюдаются устойчивые колебания численности и, следовательно, в системе должны существовать регуляторные механизмы сохранения колебательного состояния, которые не учтены в исходной модели (5.16).

Отметим сразу, что математически устойчивые колебания в системе на фазовой плоскости изображаются траекторией предельного цикла, который был рассмотрен в лекции 2 (см. рис. 2.12) на примере колебаний в цикле гликолиза (см. рис. 2.13). Проблема состоит в том, чтобы с помощью подбора соответствующих математических функций отразить в моделях роль биологических факторов взаимодействия популяций, которые не были учтены в простейшей системе Вольтерра. Затем необходимо определить характер устойчивости, в том числе наличие автоколебаний и предельного цикла в зависимости от соотношений параметров в уравнениях.

В результате анализа моделей можно определить те или иные особенности динамического поведения системы, могущие иметь общий биологический смысл. Важные биологические факторы, не учитываемые в базовой модели Вольтерра (5.16), регулируют скорость поедания жертв и насыщение пищей хищ-

ников, их конкуренцию за жертвы, размножение и смертность жертв и хищников, а также другие лимитирующие механизмы. Мы назовем некоторые из них. Так, в модели (5.13) в выражении для скорости выедания жертв (члены $a_{12}x_1x_2$) отсутствует насыщение хищника, что наблюдается лишь при небольших плотностях жертв. При больших плотностях жертв происходит насыщение, которое может описываться функцией выедания, или трофической функцией $\varphi(x)$ вида

$$\varphi(x_1) = \frac{\varphi_{\max}x_1}{1 + \alpha x_1}, \quad (5.17)$$

где φ_{\max} — максимальный рацион хищника при избытке пищи, α — плотность популяции жертв (α — постоянная, такая, что $1/\alpha$ — плотность популяции жертв, при которой рацион $\varphi(x)$ составляет половину от максимального, т. е. $\varphi(x_1) = \frac{1}{2} \varphi_{\max}$). Тогда

скорость выедания жертв выразится как $\varphi(x) \cdot x_2$. Другой эффект конкуренции хищников за жертву предлагается описывать математической функцией, также имеющей вид насыщения. Иными словами, в выражении для скорости выедания жертв вместо $\varphi(x_1) \cdot x_2$ появляется член

$$\varphi(x_1) \cdot \frac{bx_2}{1 + \beta x_2} = \frac{\varphi_{\max} \cdot x_1}{1 + \alpha x_1} \cdot \frac{bx^2}{1 + \beta x_2}, \quad (5.18)$$

который, как видно, сильно отличается от члена $a_{12}x_1x_2$ в исходной модели Вольтерра. Существует и много других математических форм записи функций размножения, гибели и выедания, которые используют для описания различных биологических ситуаций.

Понятно, что в зависимости от вида функций в правых частях уравнений возможно и различное динамическое поведение системы. Поэтому возник общий вопрос: какого рода функции могут описывать динамику численности взаимодействующих популяций (хищник — жертва) и какими особенностями будут обладать фазовые портреты моделей в зависимости от их свойств? Мы не будем вдаваться в математические подробности, а приведем сразу результат исследования (Колмогоров, 1972). Оказалось, что при разных соотношениях параметров система может обладать двумя или тремя особыми точками. Одна из них находится в начале координат $\bar{x}_1=0$, $\bar{x}_2=0$ и всегда является седлом. Две другие могут быть седлом либо устойчивым или неустойчивым фокусом и узлом. Если стационарная точка — неустойчивый фокус, то вокруг него могут существовать предельные циклы — устойчивые периодические колебательные решения (рис. 5.4). Одна из построенных моделей описывает динамику численности популяций хищник — жертва с учетом эффектов насыщения хищников и внутривидовой конкуренции

жертв и хищников. После замены переменных эта система уравнений имеет вид

$$\begin{aligned} \dot{x}_1 &= x_1 - \frac{x_1 x_2}{1 + \alpha x_1} - \epsilon x_1^2, \\ \dot{x}_2 &= -\gamma x_2 + \frac{x_1 x_2}{1 + \alpha x_1} - \mu x_2^2. \end{aligned} \quad (5.19)$$

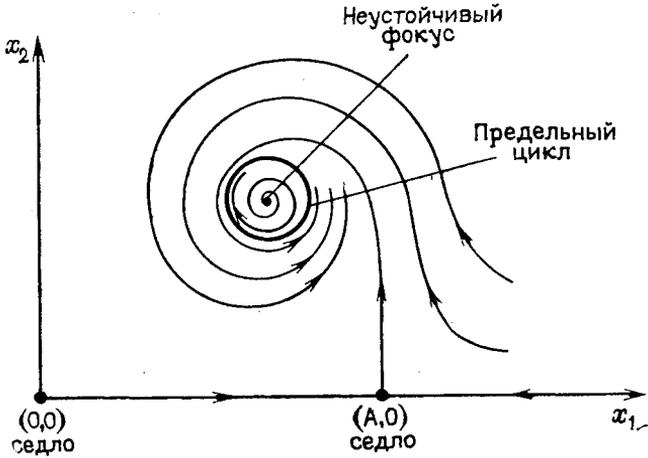


Рис. 5.4. Фазовый портрет системы, описывающей взаимодействие двух видов (Колмогоров, 1972). Выделена замкнутая траектория — предельный цикл

Эта модель имеет набор фазовых портретов в зависимости от комбинаций значений параметров. На рис. 5.5 приведен пример фазового портрета, где система обладает тремя особыми точками

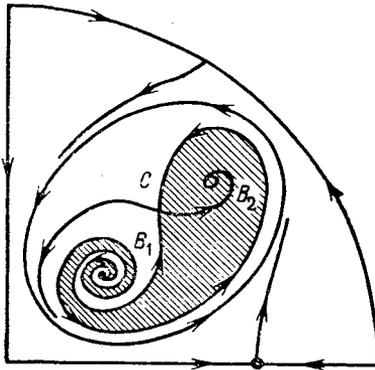


Рис. 5.5. Пример фазового портрета системы 5.19 (см. текст)

ми: B_1 — неустойчивый фокус, C — седло, B_2 — устойчивый фокус. Эти три точки окружены траекторией устойчивого предельного цикла. Система, находящаяся в неустойчивой области B_1 , может с определенной вероятностью перейти в область устойчивой точки B_2 либо на устойчивый предельный цикл. В реальных системах смена режимов с пересечением бифуркационных границ и переход из одной области устойчивости в другую проходят при достаточно сильных внешних воздействиях, изменяющих численность видов.

Стохастические модели популяций. Рассмотренные нами выше модели популяций были детерминистическими. Однако в реальной жизни система может подвергаться случайным воздействиям, что связано с флуктуациями численности видов или значений параметров системы. Кроме того, сами процессы размножения и гибели, по сути, носят вероятностный характер. При большом числе особей детерминистическое описание совпадает со стохастическим, т. е. данные о численности видов, полученные при решении дифференциальных уравнений, совпадают с соответствующими математическими ожиданиями. Однако учет стохастического характера экологических процессов становится особенно важным при небольших размерах популяций. В этом случае среднее квадратичное отклонение численности отдельно взятой популяции от математического ожидания может быть довольно значительным. Это приводит к тому, что при рассмотрении какой-либо определенной популяции график роста обнаружит значительные колебания, характеризуя тем самым флуктуационную изменчивость данного процесса и его отклонение от теоретических кривых (фазовых траекторий), задаваемых детерминистической моделью. Пусть, например, в некоторой точке фазовой траектории модели хищник — жертва какая-либо переменная (x_2) не очень велика, тогда случайные флуктуации могут привести к тому, что изображающая точка уйдет с фазовой траектории на одну из осей (ось x_1), т. е. численность одного из видов (вид x_2) обратится в нуль, а вид (x_2) вымрет. Таким образом, стохастическая модель предскажет в конечном счете вымирание одного из видов. Подчеркнем еще раз, что эти эффекты проявляются при небольших численностях популяций.

Эффекты пространственной организации. В лекции 4 мы рассматривали модели с распределенными параметрами, в которых переменные изменяются не только во времени, но и в пространстве. Будем считать, что миграция как хищников, так и жертв в пространстве носит характер случайных блужданий типа диффузии. Тогда поведение простой системы Вольтерра можно описать с помощью уравнений типа (4.6)

$$\frac{\partial x_1}{\partial t} = c_1 x_1 - a_{12} x_1 x_2 + D_1 \frac{\partial^2 x_1}{\partial r^2}, \quad (5.20)$$

$$\frac{\partial x_2}{\partial t} = a_{21} x_1 x_2 - c_2 x_2 + D_2 \frac{\partial^2 x_2}{\partial r^2}.$$

Здесь D_1, D_2 — коэффициенты диффузии (миграции) особей в ареале их распространения; эффекты самоограничения (члены $a_{11}x_1^2, a_{22}x_2^2$) отсутствуют. В этой системе при ограниченном ареале распространения сохраняется качественная картина периодических колебаний. Однако если ареал не является ограниченным, т. е. система не замкнута в пространстве, то в ней могут возникать решения в виде движущихся волн. Анализ модели (5.20) был проведен в предположении, что $D_1=0$, т. е. миграция жертв отсутствует, что в реальной ситуации означает существенно меньшую подвижность жертв по сравнению с хищниками. Решения получаются в виде волны жертв и хищников, распространяющейся в пространстве.

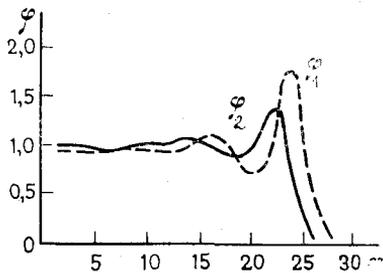


Рис. 5.6. Распределение плотности популяции хищников (ϕ_2) и жертв (ϕ_1) в пространстве

На рис. 5.6 показано распределение плотностей популяции жертв ϕ_1 и хищников ϕ_2 вдоль пространственной координаты r в фиксированный момент времени. Это есть, как говорят, «волна погони и бегства». С течением времени происходит продвижение этой волны вдоль координаты r . Естественно, что в начальной точке каждый раз происходит возрождение этих волн в силу уравнений точечной модели, соответствующих активному характеру распределенной системы (5.20).

Другим типом своеобразного пространственного поведения в экологических системах являются стационарные неоднородные распределения переменных в пространстве — диссипативные структуры, которые можно сопоставить с «пятнами жизни в природе». Особое значение имеет вопрос, каким образом связаны между собой автоколебательные режимы в точечных моделях и диссипативные структуры в соответствующих им распределенных системах.

Одна из простых точечных моделей Вольтерра, имеющих предельный цикл, представлена в виде соответствующей ей распределенной системы, как

$$\begin{aligned} \frac{\partial x_1}{\partial t} &= ax_1^2 \left(\frac{k-x_1}{x_1} \right) - bx_1x_2 + D_1 \frac{\partial^2 x_1}{\partial r^2}, \\ \frac{\partial x_2}{\partial t} &= -cx_2 + \alpha x_1x_2 + D_2 \frac{\partial^2 x_2}{\partial r^2}. \end{aligned} \quad (5.21)$$

В этой системе по сравнению с простой моделью Вольтерра член $ax_1^2 \left(\frac{k-x_1}{x_1} \right)$, описывающий динамику жертв в отсутствие

хищника, обладает кубической нелинейностью (ср. с (5.3)). Это обусловлено половым размножением жертв, когда скорость роста при малых плотностях пропорциональна числу встреч между особями, т. е. квадрату плотности популяций (ax_1^2).

Система (5.21) была исследована на ЭВМ путем численного эксперимента при условии малой подвижности жертв ($D_2/D_1 = 1000$) и таком соотношении параметров, когда в точечной системе происходят устойчивые автоколебания ($a/c=1$; $c/aK=0,4$). Оказалось, что в системе могут быть два разных режима. При одних начальных условиях устанавливается автоколебательный по времени режим при однородном в пространстве распределении компонентов. Это соответствует устойчивому предельному циклу точечной системы (рис. 5.7), когда происходят синхронные колебания численности по всему ареалу распространения.

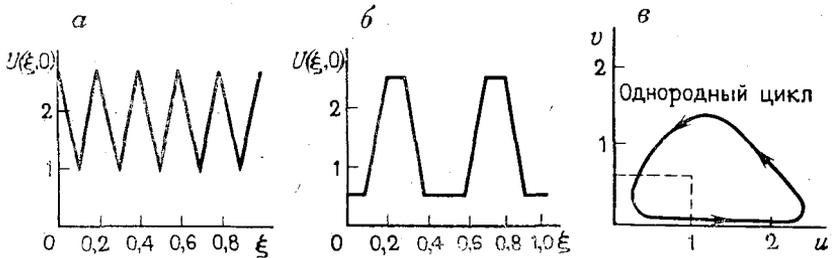


Рис. 5.7. Некоторые начальные распределения плотности популяции жертвы (а, б), приводящие к синхронным однородным колебаниям по всему кольцевому ареалу (в) (Базыкин, Маркман, 1980)

Существуют и другие начальные условия, при которых в системе со временем возникает устойчивая диссипативная структура, т. е. стационарное периодическое распределение концентраций в пространстве (рис. 5.8). В этом случае распределение хищников, быстро мигрирующих в ареале распространения, близко к однородному (они «размазываются» в системе). Наоборот, концентрация медленно мигрирующих жертв, ведущих оседлый образ жизни, различна в разных точках пространства.

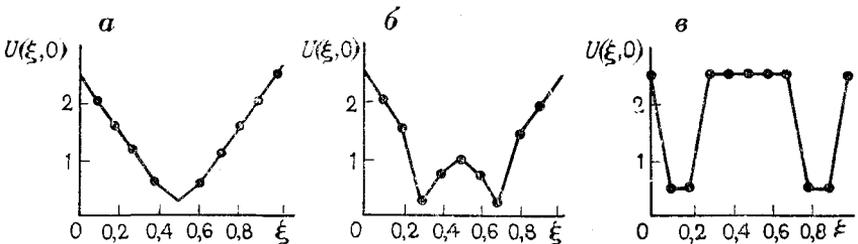


Рис. 5.8. Некоторые начальные распределения плотности популяции жертв (а, б, в), приводящие к установлению стационарной диссипативной структуры

Лекция 6. ТЕРМОДИНАМИКА НЕОБРАТИМЫХ ПРОЦЕССОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ ВБЛИЗИ РАВНОВЕСИЯ

В классической термодинамике рассматриваются главным образом равновесные состояния системы, в которых параметры не изменяются во времени. Сами по себе переходы между различными состояниями не являются предметом классической термодинамики, методы которой позволяют оценить лишь общие энергетические эффекты химических превращений путем сравнения параметров начального и конечного состояний системы. Однако в открытых системах реакции и соответствующие энергетические превращения происходят постоянно, и поэтому здесь необходимо знать скорости трансформации энергии в каждый момент времени. Это значит, что в энергетических расчетах необходимо учитывать и фактор времени, для чего как-то образом сочетать термодинамический и кинетический подходы в описании свойств открытой системы. Мы рассмотрим термодинамические критерии устойчивости стационарных состояний и критерии их достижения вблизи и вдали от равновесия, познакомимся с термодинамическими характеристиками автоколебательных и триггерных режимов.

Первый и второй законы термодинамики в биохимии. Напомним вначале содержание основных законов классической термодинамики и результаты их применения в биологии. Согласно первому закону количество теплоты δQ , поглощенной системой из внешней среды, идет на увеличение ее внутренней энергии dU и совершение общей работы δA , которая включает работу против сил внешнего давления P по изменению объема dV системы и максимально полезную работу $\delta A'_{\max}$, сопровождающую химические превращения:

$$\delta Q = dU + \delta A,$$

где работа $\delta A = pdV + \delta A'_{\max}$

или

$$\delta Q = dU + pdV + \delta A'_{\max}. \quad (6.1)$$

Опытная проверка первого закона проводилась в специальных калориметрах, где измеряется теплота, выделенная организмом в процессах метаболизма, при испарениях, а также вме-

сте с продуктами выделения. Поступающие в организм питательные вещества распадаются с освобождением заключенной в них свободной энергии, которая и используется для жизнедеятельности. Опыты проводились для реакций основного обмена на сравнительно коротком промежутке времени, когда не происходит накопления биомассы в результате роста и не совершается значительной работы. Оказалось, что выделенная организмом теплота полностью соответствует энергии, поглощенной вместе с питательными веществами. Справедливость первого закона означает, что сами по себе организмы не являются независимым источником какой-либо новой энергии.

Второй закон термодинамики дает критерий направленности самопроизвольных необратимых процессов. Всякое изменение состояния системы описывается соответствующим изменением особой функции состояния — энтропии S , которая определяется суммарной величиной поглощенных системой приведенных теплот Q/T .

Малое изменение энтропии dS равно для равновесных или больше для неравновесных процессов, чем поглощенная системой элементарная приведенная теплота $\delta Q/T$:

$$dS \geq \delta Q/T. \quad (6.2)$$

В изолированных системах $\delta Q=0$ и, следовательно,

$$dS \geq 0. \quad (6.3)$$

В этом и состоит эволюционный критерий направленности необратимых изменений в изолированных системах, которые всегда идут с увеличением энтропии до ее максимальных значений при окончании процесса и установлении термодинамического равновесия. Увеличение энтропии означает падение степени упорядоченности и организованности в системе, ее хаотизацию.

Нас будет интересовать связь между термодинамическими параметрами и величиной максимально полезной работы $\delta A'_{\max}$, которая характеризует внутренние необратимые химические превращения в системе. Из выражения (6.1) для первого закона определить $\delta A'_{\max}$ при переходе из одного состояния в другое однозначно нельзя, так как величина δQ зависит от пути перехода. Однако, комбинируя выражения (6.1) и (6.2), удастся найти особые характеристические функции, изменение которых при определенных условиях равно $\delta A'_{\max}$. В биохимических процессах наибольшее значение имеют свободная энергия F

$$F=U-TS$$

и полный термодинамический потенциал G , или энергия Гиббса,

$$G=U+PV-TS.$$

Если процессы идут при постоянных T , $V = \text{const}$, то

$$\delta A'_{\max} \leq -d(U - TS) = TdS - dU = -(dF)_{T, V},$$

а при T , $P = \text{const}$

$$\delta A'_{\max} \leq -d(U + PV - TS) = TdS - dU - PdV = -(dG)_{T, P}, \quad (6.4)$$

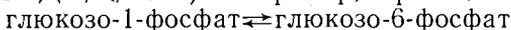
где знак неравенства соответствует необратимым процессам.

Таким образом, совершение полезной работы $\delta A'_{\max}$ сопровождается убылью свободной энергии и энергии Гиббса в необратимых процессах. Заметим, что обычно в биохимических превращениях изменением объема системы можно пренебречь $dV \approx 0$ и поэтому величины dF и dG практически совпадают. Классическая термодинамика позволяет вычислять энергетические эффекты и соответственно определять направление и возможность сопряжения различных биологических процессов.

Существуют различные методы определения величин ΔG и ΔF , которые подробно рассматриваются в курсе физической химии. Так, зная константу равновесия (K) какой-либо химической реакции, можно найти значение ΔG_0 , которое соответствует убыли ΔG при переходе от начального неравновесного состояния смеси, где все концентрации были равны единице, до конечного равновесного состояния

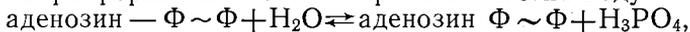
$$\Delta G_0 = -RT \ln K,$$

где R — газовая постоянная (1,987 кал/К/моль или 8,314 Дж/К/моль). Например, в реакции



константа равновесия $K = 17$, откуда следует, что $\Delta G_0 = -1700$ кал/моль < 0 . Отрицательная величина $\Delta G < 0$ указывает, что эта реакция в стандартных условиях протекает самопроизвольно и сильно сдвинута вправо, на что указывает и большая величина $K = 17 \gg 1$.

Аналогично гидролиз АТФ, протекающий с отщеплением остатка фосфорной кислоты и переносом его на воду



характеризуется отрицательной величиной $\Delta G_0 = -7$ ккал/моль. Освобождение относительно большой порции энергии при гидролизе АТФ и делает связь $\Phi \sim \Phi$ в АТФ макроэргической по сравнению с другими реакциями переноса групп.

Сравнивая значения ΔG_0 для разных процессов, можно определить, возможно ли их сопряжение, когда один процесс (сопряженный) идет с увеличением ΔG за счет уменьшения ΔG в другом процессе (сопрягающем). Так, окисление молекулы глюкозы в процессе дыхания сопровождается уменьшением $\Delta G_0 = -678$ ккал/моль. Это равно увеличению ΔG_0 в процессе фотосинтеза при образовании молекулы глюкозы из воды и CO_2 . Таким образом, с термодинамической точки зрения сопряжение фотосинтеза и дыхания является возможным. Этот же подход применяется, когда ставится задача определить возможность

сопряжения и других более простых процессов. Образование ацетилфосфата в реакции фосфорилирования

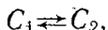
$$\text{ацетил КОА} + \text{фосфат} \rightleftharpoons \text{ацетилфосфат} + \text{КОА}$$

проходит с увеличением $\Delta G_0 = 3 \text{ ккал/моль} > 0$ и может быть легко обеспечено при сопряжении с гидролизом АТФ или с реакцией

глюкозо-1-фосфат + $\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons$ глюкоза + фосфат,
 где $\Delta G_0 = -4,8 \text{ ккал/моль}$.

Заметим, что во всех этих случаях можно говорить лишь о термодинамической вероятности процесса, но не о фактическом протекании по данному молекулярному механизму. Кроме того, непосредственный характер самого изменения свободной энергии во времени в ходе реакции или при сопряжении разных процессов при таком подходе не учитывается.

Движущая сила химического процесса связана с разностью химических потенциалов μ начальных и конечных продуктов. Когда эта разность обращается в нуль, то процесс прекращается, а в системе устанавливается равновесие, где скорости прямой и обратной реакций равны между собой. Например, в простейшем случае мономолекулярной реакции, где стехиометрические коэффициенты равны единице



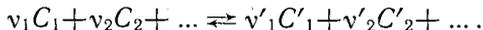
движущая сила A равна просто разности химических потенциалов μ_{C_1} и μ_{C_2} :

$$A = \mu_{C_1} - \mu_{C_2}.$$

Здесь $\mu_{C_i} = \mu_0 + RT \ln C_i$ — химический потенциал вещества C_i . Величина A называется еще химическим сродством реакции. Она может быть записана как

$$A = -\sum v_i \mu_i, \quad (6.5)$$

где v_i — стехиометрические коэффициенты в уравнении реакции



Они входят в (6.5) со знаком «минус» для веществ из левой части и со знаком «плюс» для веществ из правой части уравнения реакции. В равновесии, где все $C_i = C_i^{\text{равн}}$, величина A обращается в нуль.

Изменение энтропии в открытых системах

Применение второго закона к биологическим системам в его классической формулировке приводит, как кажется на первый взгляд, к парадоксальному выводу, что процессы жизнедеятельности идут с нарушением принципов термодинамики. В самом деле, усложнение и увеличение упорядоченности организмов в период их роста происходит самопроизвольно. Оно сопровождается уменьшением, а не увеличением энтропии, как следовало

бы из второго закона. Ясно, что увеличение энтропии в необратимых самопроизвольных процессах должно происходить в изолированных системах, а биологические системы являются открытыми. Проблема поэтому заключается в том, чтобы понять, как связано изменение энтропии с параметрами процессов в открытой системе, и выяснить, можно ли предсказать общее направление необратимых процессов в открытой системе по изменению ее энтропии. Главная трудность в решении этой проблемы состоит в том, что мы должны учитывать изменение всех термодинамических величин во времени непосредственно в ходе процессов в открытой системе. Постулируется, что общее изменение энтропии dS открытой системы может происходить независимо либо за счет процессов обмена с внешней средой d_eS , либо вследствие внутренних необратимых процессов (d_iS)

$$dS = d_eS + d_iS. \quad (6.6)$$

Во всех реальных случаях $d_iS > 0$, и только если внутренние процессы идут обратимо и равновесно, то $d_iS = 0$. Для изолированных систем $d_eS = 0$, и мы приходим к классической формулировке второго закона:

$$dS = d_iS = 0.$$

В клеточном метаболизме всегда таких две группы процессов. Например, поступление извне глюкозы, выделение наружу продуктов ее окисления (d_eS) и окисление глюкозы в процессах дыхания (d_iS).

В фотосинтезе приток свободной энергии света приводит к появлению сложной молекулы глюкозы из простых соединений H_2O и CO_2 и уменьшению энтропии клетки $d_eS < 0$, а распад глюкозы в дыхании в клетке увеличивает ее энтропию $d_iS > 0$. В зависимости от соотношения скоростей изменения d_eS и d_iS общая энтропия dS открытой системы может со временем либо увеличиваться, либо уменьшаться. Продифференцируем выражение (6.6)

$$\frac{dS}{dt} = \frac{d_eS}{dt} + \frac{d_iS}{dt}. \quad (6.7)$$

Если $\frac{d_eS}{dt} < 0$ и $\left| \frac{d_eS}{dt} \right| > \frac{d_iS}{dt}$, то энтропия открытой системы уменьшается $\frac{dS}{dt} < 0$. Отрицательная величина $\frac{d_eS}{dt} < 0$ или приток отрицательной энтропии соответствует оттоку во внешнюю среду положительной энтропии и притоку извне питательных веществ с освобождением в организме заключенной в них свободной энергии. Если же $\left| \frac{d_eS}{dt} \right| < \frac{d_iS}{dt}$, то $\frac{dS}{dt} > 0$, что соответствует

общей дегградации и распаду открытой системы. В стационарном состоянии

$$\frac{d_e S}{dt} < 0, \quad \left| \frac{d_e S}{dt} \right| = \frac{d_i S}{dt} \quad \text{и} \quad \frac{dS}{dt} = 0.$$

Связь $d_i S$ с параметрами открытой системы. Будем считать, что процессы обмена открытой системы со средой проходят равновесно, а единственной причиной необратимости и увеличения энтропии системы являются ее внутренние процессы. Они ведут к уменьшению ее термодинамического потенциала. В этом случае

$$\frac{d_i S}{dt} = - \frac{1}{T} \left(\frac{dG}{dt} \right)_{T, P}. \quad (6.8)$$

Можно показать, что скорость возникновения положительной энтропии внутри открытой химической системы зависит от химического сродства A и скорости реакции v

$$\frac{d_i S}{dt} = \frac{1}{T} A v > 0. \quad (6.9)$$

При $A=0$, $v=0$ внутри системы устанавливается равновесие и

$$\frac{d_i S}{dt} = 0. \quad (6.10)$$

Выражение (6.9) имеет простой смысл. Оно показывает, что скорость образования в системе положительной энтропии в ходе необратимого химического процесса прямо пропорциональна его движущей силе A и скорости v . Очевидно, величина $\frac{d_i S}{dt}$ является переменной, поскольку в ходе химической реакции все время изменяются переменные концентрации реагирующих веществ, а следовательно, и зависящие от них величины A и v . Ниже мы рассмотрим вопрос, как ведет себя величина $\frac{d_i S}{dt}$ в стационарном состоянии, где все концентрации принимают постоянные значения. Если в системе одновременно протекает несколько химических реакций, ($j=1, 2, \dots, n$), то общая скорость продуцирования положительной энтропии зависит от их движущих сил и и скоростей, как

$$T \frac{d_i S}{dt} = A_1 v_1 + A_2 v_2 + \dots + A_n v_n = \sum_j A_j v_j > 0. \quad (6.11)$$

Сопряжение процессов. Пусть у нас протекают две необратимые реакции ($A_1 v_1$ и $A_2 v_2$). Тогда

$$T \frac{d_i S}{dt} = A_1 v_1 + A_2 v_2 > 0. \quad (6.12)$$

где величина суммарной скорости (или потока) равна разности скоростей прямой $\vec{v} = kC_1$ и обратной $\overleftarrow{v} = kC_2$ реакций:

$$I = \vec{v} - \overleftarrow{v} = kC_1 - kC_2.$$

Очевидно, в равновесии $\vec{v} = \overleftarrow{v}$ и $I = 0$, а около равновесия $I \cong 0$. Величина химического сродства A вблизи равновесия также очень мала

$$A = \mu_{C_1} - \mu_{C_2} \ll RT.$$

Здесь же наблюдается и пропорциональность между I и A . Если в открытой системе у равновесия протекает одновременно несколько процессов, то между ними существуют термодинамические соотношения, отражающие их взаимное влияние. Для двух процессов (I_1, X_1) и (I_2, X_2) эти соотношения имеют вид

$$\begin{aligned} I_1 &= L_{11}X_1 + L_{12}X_2, \\ I_2 &= L_{21}X_1 + L_{22}X_2, \end{aligned} \quad (6.18)$$

где постоянные коэффициенты L_{11} , L_{22} отражают зависимость потока от своей силы, а коэффициенты L_{12} , L_{21} соответствуют взаимному влиянию силы одного процесса на поток другого процесса. Они носят название коэффициентов взаимности Онзагера, а уравнения (6.18) называются линейными соотношениями Онзагера. Вблизи равновесия

$$L_{12} = L_{21}.$$

Теперь мы можем установить количественную связь между одновременно протекающими в клетке процессами, не зная их молекулярных механизмов.

Рассмотрим процесс активного переноса вещества через мембрану, который происходит за счет энергии сопрягающего метаболического процесса и поэтому может идти против градиента концентрации переносимого вещества. Тогда

$$\begin{aligned} I_1 &= L_{11}X_1 + L_{12}X_2, \\ I_2 &= L_{21}X_1 + L_{22}X_2, \quad L_{12} = L_{21}, \end{aligned}$$

где процесс (I_1, X_1) сопряженного переноса идет против градиента силы X_1 ($I_1X_1 < 0$) за счет энергии сопрягающего процесса ($I_2X_2 > 0$). Если сопряжение отсутствует, то $L_{12} = L_{21} = 0$ и процессы идут независимо друг от друга под действием только «своих» движущих сил

$$I_1 = L_{11}X_1, \quad I_2 = L_{22}X_2.$$

В качестве меры сопряжения вводится величина

$$q = \frac{L_{12}}{\sqrt{L_{11}L_{22}}}.$$

Она равна $q = 0$, когда сопряжение отсутствует ($L_{12} = 0$), и $q = 1$ при полностью сопряженных процессах. В начальные мо-

менты «запуска» системы большая скорость сопрягающего процесса I_2 снижается до минимальных значений и одновременно с этим растет величина X_1 . В результате таких изменений устанавливается стационарное состояние, когда результирующий сопряженный поток обращается в нуль $\bar{I}_1=0$. Если система полностью сопряжена, то и для сопрягающего потока устанавливается стационарное состояние $\bar{I}_2=0$. В этом случае в системе нет видимых изменений и вся энергия сопрягающего потока тратится на поддержание силы X_1 . Можно мысленно представить себе колесо турбины, погруженное в струю воды. В зависимости от глубины погружения изменяются число лопастей колеса турбины в воде (X_1), скорости ее движения (I_1) и потока воды (I_2). Эти примеры справедливы не только для активного переноса, но и для других случаев. Так, в системе дыхательного контроля в митохондриях скорость окисления субстрата (I_2) связана с отношением АДФ/АТФ, т. е. движущей силой X_1 . В состоянии митохондрий, когда концентрация АДФ равна нулю и видимого образования АТФ не происходит ($I_1=0$), вся энергия тратится на поддержание максимального фосфатного потенциала (X_1^{\max}). Добавление разбавителей уменьшает величину X_1 , но тогда уже $I_1 \neq 0$, что приводит к ускорению сопрягающего потока.

Коэффициент трансформации энергии в сопряженных процессах равен $I_1 X_1 / I_2 X_2$ и в митохондриях может достигать значений 80—90%. Применение уравнений Онзагера позволяет получить характеристики макромолекулярных комплексов — биологических трансформаторов энергии, не прибегая к детальному анализу механизмов их функционирования.

Теорема Пригожина. Мы уже видели, что в стационарном состоянии в открытой системе

$$\frac{dS}{dt} = \frac{d_e S}{dt} + \frac{d_i S}{dt} = 0,$$

причем каждый из членов $\frac{d_e S}{dt}$ и $\frac{d_i S}{dt}$ отличен от нуля. Возникает

вопрос: можно ли по характеру изменения величины $\frac{d_i S}{dt}$ во

времени предсказать установление в открытой системе стационарного состояния? Пусть в открытой системе вблизи равновесия одновременно протекают два процесса, для которых справедливы соотношения Онзагера (6.18) и (6.19). Если один из процессов ($I_1 X_1$) находится в стационарном режиме, то для него $\bar{I}_1=0$. Найдем величину

$$T \frac{d_i S}{dt} = I_1 X_1 + I_2 X_2 = L_{11} X_1^2 + 2L_{12} X_1 X_2 + L_{22} X_2^2, \quad (6.19)$$

которая, как видно, представляет собой положительную квадратичную форму. При приближении к стационарному состоянию

определенным образом изменялись движущая сила X_1 и поток I_1 , так что в конце концов $\bar{I}=0$. Посмотрим теперь, как зависит $T \frac{d_i S}{dt}$ от изменения X_1 . Для этого возьмем частную производную

водную $\frac{\partial \left(T \frac{d_i S}{dt} \right)}{dX_1}$ при постоянном X_2 и T . Получим из (6.20), что

$$\left[\frac{\partial \left(T \frac{d_i S}{dt} \right)}{\partial x_1} \right]_{X_2 = \text{const}} = 2(L_{11}X_1 + L_{12}X_2) = 2I_1.$$

Но в стационарном состоянии $I_1 = \bar{I}_1 = 0$. Следовательно, равенства

$$\left[\frac{\partial \left(T \frac{d_i S}{dt} \right)}{\partial x_1} \right]_{X_2 = \text{const}} = 0 \text{ и } I_1 = \bar{I}_1 = 0$$

эквивалентны. Обращение в нуль частной производной от

$T \left(\frac{d_i S}{dt} \right)$ по X_1 в стационарной точке $I = \bar{I}_1 = 0$ означает, что в ста-

ционарном состоянии положительная функция $\frac{d_i S}{dt}$ имеет эк-

стремум и принимает соответственно минимальное положительное значение. Следовательно, по мере приближения к стационарному состоянию скорость образования энтропии внутри открытой системы монотонно уменьшается, постепенно приближаясь к своему минимальному положительному постоянному значению. В этом состоит критерий направленности необратимых процессов в открытых системах, находящихся вблизи равновесия, где справедливы соотношения Онзагера. Если система

находится в стационарном состоянии, где величина $T \frac{d_i S}{dt}$ мини-

мальна, то любые отклонения от стационарной точки вследствие возмущений вызовут ее увеличение. Но тогда в силу теоремы Пригожина величины сил и потоков в системе должны изменяться таким образом, что скорость образования энтропии

$T \frac{d_i S}{dt}$ опять начнет уменьшаться, а система вернется к стационар-

ной точке. Это и означает устойчивость данного стационарного состояния.

Из монотонного характера изменения $T \frac{d_i S}{dt}$ следует, что

вблизи равновесия стационарное состояние не может представлять собой автоколебательный режим. Действительно, в этом случае переменные концентрации в системе, а следовательно,

величины I и X изменяются периодически, что несовместимо с однонаправленным монотонным изменением $T \frac{d_i S}{dt}$ и ее постоянством в стационарной точке. Экспериментальные измерения скорости образования энтропии внутри системы можно проводить в калориметрах, изучая тепловые потоки, сопровождающие образование энтропии при необратимых изменениях в системе. В опытах на биологических объектах было показано, например, что скорость теплопродукции и интенсивность дыхания в процессе развития зародышей непрерывно уменьшаются, начиная с первых стадий развития организма, и достигают постоянных значений в стационарной фазе роста. Следует, однако, иметь в виду, что уровень термогенеза может меняться в ходе развития организма не только вследствие изменения величин движущих сил и потоков. Теплопродукция организма зависит и от состояния мембранных структур и степени сопряжения процессов окислительного фосфорилирования. Наконец, принципиально и то, что биологические системы находятся вдали от равновесия, где пропорциональность I и X (6.18) или соотношения взаимности (6.19) нарушаются. Это особенно важно для биохимических процессов, где наиболее характерны переходы с изменениями ΔG 1—2 ккал/моль, а линейные соотношения Онзагера справедливы при $\Delta G \leq 0,2$ ккал/моль. В таких условиях в стационарных состояниях, далеких от равновесия, теорема Пригожина несправедлива (автоколебательный режим).

Термодинамика активного транспорта

Мы рассмотрим систему активного транспорта одного иона (натрия), не сопряженного с переносом других веществ. Для простоты рассуждения будем считать, что можно выделить один метаболический процесс, приводящий в движение активный транспорт натрия (см. рис. 6.1).

Обозначим скорость активного транспорта катиона через I^{a+} , скорость метаболизма через I_r , тогда

$$\begin{aligned} I^{a+} &= L^{a+} X_+ + L^{a+r} A, \\ I_r &= L^{a+r} X_+ + L^r A, \end{aligned} \quad (6.20)$$

где X_+ — отрицательная разность электрохимических потенциалов катиона (идущего против градиента «своей» движущей силы), A — сродство метаболической реакции, обеспечивающей транспорт. В случае одной метаболической реакции (гидролиз АТФ) скорость потребления и производства всех метаболитов связаны стехиометрически. Поэтому для оценки скорости метаболизма можно взять, например, скорость потребления O_2 в дыхании. Тогда сродство A может быть выражено как отрицательное изменение полного термодинамического потенциала метаболической реакции (гидролиз АТФ) на моль потребленного O_2 .

Напомним, что электрохимический потенциал иона $\bar{\mu}$ скла-

дывается из его химического потенциала $\bar{\mu}$ и электрического потенциала φ на мембране и равен

$$\bar{\mu} = \mu_0 + RT \ln C_+ + Z F \varphi,$$

где F — число Фарадея (96 500 кулон/моль); Z — валентность иона, C_+ — концентрация иона. Феноменологические коэффициенты L^a связывают активный транспорт (I_+^a) с метаболизмом (I_r) вследствие сопряжения и взаимного влияния потоков и сил этих процессов. Таким образом, для одновалентного иона движущая сила X_+ равна

$$X_+ = \Delta \bar{\mu} = RT \ln \frac{C_+^i}{C_+^o} + F \Delta \varphi. \quad (6.21)$$

Помещая с обеих сторон мембраны одинаковые растворы ($\Delta C = C_+^i - C_+^o = 0$) и изменяя $\Delta \varphi$, можно найти из (6.20) феноменологические коэффициенты

$$L_{+}^{a+} = \frac{\partial I_+^a}{\partial X_+} = - \frac{\partial I_+^a}{\partial (F \Delta \varphi)} = - \frac{\Delta I_+^a}{\Delta (F \Delta \varphi)} \quad (\Delta C = 0, A = \text{const}),$$

$$L_{+r}^a = \frac{\partial I_r}{\partial X_+} = - \frac{\partial I_r}{\partial (F \Delta \varphi)} = - \frac{\partial I_r}{\partial (F \Delta \varphi)} = - \frac{\Delta I_r}{\Delta (F \Delta \varphi)}$$

$$(\Delta C = 0, A = \text{const}).$$

Коэффициенты L_{+}^{a+} и L_{+r}^a определяются из наклона соответствующих прямых $\Delta I_+^a = -L_{+}^{a+} \Delta (F \Delta \varphi)$ и $\Delta I_r = -L_{+r}^a \Delta (F \Delta \varphi)$. Условие постоянства A при кратковременных изменениях X_+ облегчает проведение термодинамического анализа.

Так, для потока натрия в тканях кожи лягушки уравнения имеют вид

$$I_{Na}^a = L_{Na} X_{Na} + L_{Na, r} A,$$

$$I_r^{sb} = L_{Na, r} X_{Na} + L_r A. \quad (6.22)$$

Величина I_{Na}^a принимается положительной, когда поток направлен от наружной (слизистой) к внутренней (серозной) поверхности ткани. Величина I_r^{sb} есть скорость той части общего процесса дыхания (поглощение кислорода), которая связана непосредственно с транспортом и превышает уровень основного обмена веществ. I_r^{sb} — супробазальный поток метаболической реакции. Очевидно, в экспериментальных условиях для нахождения коэффициентов и сохранения линейных зависимостей в уравнениях (6.22) важно сохранить параметры системы и уметь направленно варьировать X_{Na} при постоянстве A . Опыты проводились на коже лягушки, где варьировали значения X_{Na} путем изменения $\Delta \varphi$. При этом сохранялся состав омывающей жидкости и концентрация натрия поддерживалась неизменной. В этих условиях $X_+ \simeq -F \Delta \varphi$ и уравнения транспорта принимают вид

$$\begin{aligned}
 I_{Na}^a &= L_{Na}(-F \Delta\varphi) + L_{Na,r}A, \\
 I_r^{sb} &= L_{Na,r}(-F \Delta\varphi) + L_rA,
 \end{aligned}
 \tag{6.24}$$

где $\Delta\varphi = \varphi^i - \varphi^o$.

В прямых экспериментах была подтверждена линейная зависимость скорости активного транспорта I_{Na}^a от $\Delta\varphi$ на коже лягушки, где $\Delta\varphi$ изменяли симметрично в области $0 \rightarrow \pm 80$ мВ. Величину I_2 можно определять по поглощению O_2 с применением кислородных электродов. Оказалось, что при симметричных возмущениях потенциала соотношение между I_r и $\Delta\varphi$ было линейным в интервале $0 \rightarrow \pm 70$ мВ. Была изучена также зависимость I_{Na}^a и I_r^{sb} от наружной концентрации натрия в условиях постоянства его внутренней концентрации при постоянной нулевой разности электрических потенциалов ($\Delta\varphi = 0$). В этих условиях также наблюдалась линейная зависимость скорости активного транспорта I_{Na} и субробазального поглощения кислорода I_r^{sb} от разности химических потенциалов $\Delta\bar{\mu}_{Na}$ на мембране. Однако если X_{Na} изменять путем варьирования внутренней концентрации натрия, то линейность уже не соблюдается. Это обусловлено изменениями в микроструктуре и составе самой мембраны.

Подобные исследования были успешно проведены и в отношении активного транспорта протонов с применением уравнений неравновесной термодинамики для двух потоков. Во всех случаях варьирование X_+ позволяет оценить феноменологические коэффициенты и сродство A движущей метаболической реакции. В последнее время успешно применяют подобный формализм для описания процессов фосфорилирования в митохондриях и хлоропластах. Считается общепринятым, что в этих объектах имеется тесное сопряжение между тремя главными процессами, лежащими в основе биоэнергетики клеточных мембран: электронный транспорт с окислением субстрата (I_0, A_0), фосфорилирование АДФ с образованием АТФ (I_p, A_p), транслокация протонов через сопрягающую мембрану ($I_H, \Delta\bar{\mu}_H$). Ключевую роль играет трансмембранная циркуляция протонов, которая индуцируется переносом электронов и в свою очередь «запускает» синтез АТФ. Феноменологическое описание системы включает соответственно три уравнения

$$\begin{aligned}
 I_p &= L_p A_p + L_{pH} \Delta\bar{\mu}_H + L_{p0} A_0, \\
 I_H &= L_{pH} A_p + L_H \Delta\bar{\mu}_H + L_{0H} A_0, \\
 I_0 &= L_{p0} A_p + L_{0H} \Delta\bar{\mu}_H + L_0 A_0,
 \end{aligned}
 \tag{6.25}$$

где смысл коэффициентов L очевиден. Применение уравнений (6.25) возможно в условиях, когда можно варьировать и изменять величины сродства A_0 и A_p в широких пределах, а также оценивать $\Delta\bar{\mu}_H$ по разности рН и электрических потенциалов на сопрягающих мембранах. Как оказалось, здесь также имеет

место линейная зависимость между силами и потоками, что должно позволить найти опытным путем коэффициенты L . Для этого в экспериментах можно упростить ситуацию, поддерживая $A_0 = \text{const}$, но не регулируя $\Delta\mu_n$ и добиваясь стационарного состояния, когда $I_n = 0$. Можно поддержать $\Delta\mu_n$ равным нулю. В обоих случаях уравнения (6.25) упростятся, так что их используют для оценки конкретных данных. На основе такого подхода обсуждаются различные гипотезы энергетического сопряжения. В частности, хемиосмотическая гипотеза предполагает непосредственную связь с образованием АТФ только транслокации протонов, но не переноса электронов. В предельном случае коэффициент I_{p0} должен быть равен нулю. Надо, конечно, ясно понимать, что термодинамический анализ может помочь оценить энергетическую эффективность и степень сопряжения процессов, но ничего не говорит об их молекулярных механизмах.

Лекция 7. ТЕРМОДИНАМИКА СИСТЕМ ВДАЛИ ОТ РАВНОВЕСИЯ

Определить возможность самопроизвольного перехода изолированной системы между двумя состояниями можно методами классической термодинамики. В открытой системе возникают стационарные состояния, которые могут находиться либо вблизи, либо далеко от термодинамического равновесия. Вопрос о возможности перехода открытой системы из некоего начального в конечное стационарное состояние можно решить, сравнивая величины скорости образования энтропии в этих состояниях, если они оба лежат в области линейной термодинамики, т. е. вблизи термодинамического равновесия. Однако вдали от равновесия уже нельзя сделать однозначных выводов о том, как меняется скорость образования энтропии. Эволюция таких неравновесных динамических систем определяется прежде всего кинетикой взаимодействия составных элементов и движением системы по фазовым траекториям, а не статистической упорядоченностью начального и конечного состояний системы. Такие системы имеют ограниченное число конечных состояний и ведут себя наподобие «химических машин». Поэтому распространение идей термодинамики на неравновесные системы может дать лишь дополнительную характеристику далеких от равновесия стационарных состояний, положение и пути достижения которых определяются исходными дифференциальными уравнениями.

Устойчивость стационарных точек. Остановимся кратко на термодинамических признаках устойчивости стационарных точек, свойства которых были рассмотрены в лекциях 1—4. Допустим, что в стационарном состоянии возникли возмущения, вызвавшие отклонения δX и δI величин сил и потоков от их стационарных значений (\bar{X}) и (I). Оказывается, что в случае, если начальное стационарное состояние было устойчивым, то произведение величин «возмущений» δI и δX должно быть положительным

$$\delta I \delta X > 0.$$

Это является критерием устойчивости стационарных состояний вдали от равновесия. Однако получить общие термодинамические критерии направления движения к стационарному состоянию, далекому от равновесия, не удастся. Причина состоит в детерминистском характере поведения кинетических систем,

для которых понятие энтропии, в отличие от равновесных, не имеет решающего значения для предсказания направления переходных процессов.

Сопоставим характер устойчивости стационарной точки со степенью ее удаленности от положения термодинамического равновесия. Вблизи равновесия возможны только устойчивые стационарные точки типа «узла». По мере удаления от равновесия будут расти величины X и I (рис. 7.1), и система может покинуть область линейной термодинамики, не теряя общей устойчивости.

Этому соответствует точка «устойчивый фокус». Возможно, однако, что при удалении от равновесия в системе наступит бифуркационное изменение и возникнет неустойчивость. Неустойчивые стационарные точки, которыми обладает система вдали от равновесия, относятся к «седлам» или «неустойчивым фокусам».

В точке бифуркации, где теряется устойчивость, произведение $(\delta I \cdot \delta X)$ становится отрицательным $(\delta I \cdot \delta X < 0)$, что соответствует термодинамическому порогу

появления неустойчивости в системе. Возникает, как говорят, термодинамическая флуктуация, уводящая систему от неустойчивой точки, которая и может стать причиной распада системы. Однако при определенных значениях параметров эта флуктуация как бы дает толчок, переводящий систему к новому состоянию, которому и передается устойчивость. Например, появление предельного цикла около неустойчивого фокуса. Возникновению диссипативных структур в распределенных системах также предшествует нарушение термодинамической устойчивости вдали от равновесия. Наконец, триггерные переходы между устойчивыми стационарными состояниями (см. рис. 3.4) происходят на границе устойчивости на кривой стационарных состояний, когда нарушается термодинамическая устойчивость и система совершает скачкообразный переход между устойчивыми состояниями.

Таким образом, термодинамические признаки устойчивости стационарных состояний совпадают с соответствующими математическими признаками и могут служить их дополнительной характеристикой. Но вдали от равновесия уже не существует общих термодинамических критериев направления движения открытой системы, поскольку ее поведение определяется динамическими свойствами и механизмами регуляции, а не общими статистическими закономерностями. Эта особенность обуславливает также и сложность применения понятий энтропии и ин-

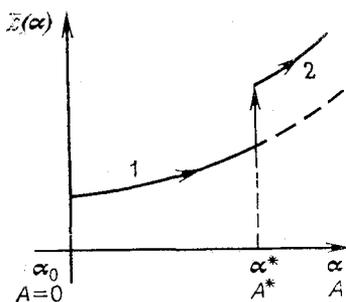


Рисунок. Зависимость стационарной концентрации компонента \bar{x} от параметра α , изменяющего отклонения от равновесия

формации при описании общих свойств биологических систем.

Энтропия и информация. Согласно формуле Больцмана, энтропия определяется как логарифм числа микросостояний, возможных в данной макроскопической системе

$$S = k_B \ln W, \quad (7.1)$$

где $k_B = 1,38 \cdot 10^{-16}$ эрг·град⁻¹, или $3,31 \cdot 10^{-24}$ энтропийных единиц (1 э. с. = 1 кал·град⁻¹ = 4,1 Дж/К), или $1,36 \cdot 10^{-23}$ Дж/К — постоянная Больцмана, W — число микросостояний (например, число способов, которыми можно разместить молекулы газа в сосуде). Именно в этом смысле энтропия есть мера неупорядоченности и хаотизации системы. В реальных системах существуют устойчивые и неустойчивые степени свободы. Например, твердые стенки сосуда и молекулы заключенного в нем газа. Понятие энтропии связано именно с неустойчивыми степенями, по которым возможна хаотизация системы, а число возможных микросостояний намного больше единицы. В полностью устойчивых системах реализуется только одно-единственное решение, т. е. число способов, которыми осуществляется это единственное макросостояние системы, равно единице ($W=1$), а энтропия равна нулю. В биологии использовать понятие энтропии, а также и термодинамические представления можно только по отношению к конкретным метаболическим процессам, а не для описания в целом поведения и общеприродных свойств организмов. Связь энтропии и информации в теории информации была установлена для статистических степеней свободы. Допустим, что мы получили информацию о том, каким конкретно способом из всех возможных способов осуществлено данное макросостояние системы. Очевидно, количество информации, которое мы при этом получали, будет тем больше, чем больше была исходная неопределенность или энтропия системы.

Согласно теории информации в этом простом случае количество информации о единственном реальном состоянии системы будет равно

$$I = \log_2 W. \quad (7.2)$$

За единицу количества информации (бит) принимается информация, содержащаяся в достоверном сообщении, когда число исходных возможных состояний было равно $W=2$:

$$I = \log_2 2 = 1 \text{ бит}. \quad (7.3)$$

Например, сообщение о том, на какую сторону упала монета при бросании в воздух, содержит количество информации в 1 бит. Сопоставляя формулы (7.1) и (7.2), можно найти связь между энтропией (в энтропийных единицах) и информацией (в битах)

$$S (\text{э. е.}) = 2,3 \cdot 10^{-24} I \text{ бит}. \quad (7.4)$$

Теперь попытаемся формально оценить количество информа-

ции, содержащейся в теле человека, где имеется 10^{13} клеток. С помощью формулы (7.2) получим величину

$$I = \log_2 10^{13!} \sim 10^{13} \log_2 10^{13} \sim 4 \cdot 10^{14} \text{ бит.}$$

Такое количество информации необходимо было бы исходно получить, чтобы осуществить единственно правильное расположение клеток в организме. Этому эквивалентно весьма незначительное снижение энтропии системы на

$$\Delta S = 2,3 \cdot 10^{-24} \cdot 4 \cdot 10^{14} \sim 10^{-9} \text{ э. е.} \sim 4 \cdot 10^{-9} \text{ Дж/К.}$$

Если считать, что в организме осуществляется также уникальный характер расположения аминокислотных остатков в белках и нуклеотидных остатков в ДНК, то общее количество информации, содержащейся в теле человека, составит

$$I \sim 1,3 \cdot 10^{26} \text{ бит,}$$

что эквивалентно небольшому понижению энтропии на $\Delta S \sim 300 \text{ э. е.} = 1200 \text{ Дж/К.}$ В процессах метаболизма это снижение энтропии легко компенсируется увеличением энтропии при окислении 900 молекул глюкозы. Таким образом, сопоставление формул (7.1) и (7.2) показывает, что биологические системы не обладают какой-либо повышенной информационной емкостью по сравнению с другими неживыми системами, состоящими из того же числа структурных элементов. Этот вывод на первый взгляд противоречит роли и значению информационных процессов в биологии.

Однако связь между I и S в (7.4) справедлива лишь по отношению к информации о том, какое из всех W микросостояний реализовано в данный момент. Эта микроинформация, связанная с расположением всех атомов в системе, на самом деле не может быть запомнена и сохранена, поскольку любое из таких микросостояний быстро перейдет в другое из-за тепловых флуктуаций. А ценность биологической информации определяется не количеством, а прежде всего возможностью ее запоминания, хранения, переработки и дальнейшей передачи для использования в жизнедеятельности организма.

Основное условие восприятия и запоминания информации — это способность рецепторной системы вследствие полученной информации, переходить в одно из устойчивых состояний, заранее заданных в силу ее организации. Поэтому информационные процессы в организованных системах связаны только с определенными степенями свободы. Сам процесс запоминания информации должен сопровождаться некоторой потерей энергии в рецепторной системе для того, чтобы она могла в ней сохранить достаточное время и не теряться вследствие тепловых флуктуаций. Именно здесь и осуществляется превращение микроинформации, которую система не могла запомнить, в макроинформацию, которую система запоминает, хранит и затем может передать другим акцепторным системам. Как говорят, энтропия

есть мера множества незапоминаемых системой микросостояний, а макроинформация — мера множества их состояний, о пребывании в которых система должна помнить.

Например, информационная емкость в ДНК определяется только количеством определенных нуклеотидов, а не общим числом микросостояний, включающих колебания всех атомов цепочки ДНК. Процесс запоминания информации в ДНК — это фиксация определенного расположения нуклеотидов, которое устойчиво вследствие образующихся химических связей в цепочке. Дальнейшая передача генетической информации осуществляется в результате биохимических процессов, в которых диссипация энергии и образование соответствующих устойчивых химических структур обеспечивает эффективность биологической переработки информации. В целом информационные процессы широко распространены в биологии. На молекулярном уровне они протекают не только при запоминании и переработке генетической информации, но и при взаимном узнавании макромолекул, обеспечивают специфичность и направленный характер ферментативных реакций, имеют важное значение при взаимодействии клеточных мембран и поверхностей. Физиологические рецепторные процессы, играющие самостоятельную информационную роль в жизнедеятельности организма, также основаны на взаимодействиях макромолекул. Во всех случаях макроинформация возникает исходно в виде конформационных изменений при диссипации части энергии по определенным степеням свободы во взаимодействующих макромолекулах. В результате макроинформация оказывается записанной в виде набора достаточно энергетически глубоких конформационных подсостояний, которые позволяют сохранять эту информацию в течение времени, необходимого для ее дальнейшей переработки. Биологический смысл этой макроинформации реализуется уже в соответствии с особенностями организации биологической системы и конкретными клеточными структурами, на которых разыгрываются дальнейшие процессы, приводящие в итоге к соответствующим физиолого-биохимическим эффектам.

Лекция 8. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ СТРОЕНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ

Макромолекула — основная структурная единица живого — включает большое количество атомов и атомных групп. Их тепловое движение, повороты и вращения вокруг единичных связей обуславливают большое число внутримолекулярных степеней свободы, что придает макромолекуле статистические свойства. Одновременно в той же макромолекуле между атомами существуют химические связи, ближние и дальние взаимодействия которых придают вполне определенный детерминистский характер ее конформационным перестройкам. Таким образом, биологическая макромолекула обладает своеобразными свойствами, в основе которых лежит тесное взаимодействие статистических и детерминистских (механических) степеней свободы. В простых химических процессах в растворах продукт реакции появляется вследствие активных соударений молекул реагентов. В отличие от этого результат функционирования макромолекулы в биохимических процессах достигается прежде всего вследствие взаимодействия частей единого активного макромолекулярного комплекса. В химии растворов рост температуры вызывает увеличение доли активных кинетических соударений молекул, а в макромолекулярных комплексах этот же фактор может повлиять на их структурную организацию и тем самым на механизм и эффективность внутримолекулярных взаимодействий. Для таких систем, строго говоря, неприменимо понятие химического потенциала как движущей силы процесса, зависящей от исходного числа реагентов. В случае макромолекулярных комплексов реакция определяется не их числом как таковым, а внутримолекулярными взаимодействиями в каждом из них. Это хорошо видно на примере ферментативного катализа.

Основная задача молекулярной биофизики состоит в том, чтобы, исходя из характера взаимодействия атомных групп, определяющих информацию макромолекулы, раскрыть природу ее внутримолекулярной динамики. На этой основе мы перейдем к рассмотрению электронных свойств и физических принципов функционирования макромолекул (белков) в биохимических процессах.

Клубок и глобула. Полимерная цепь, где взаимодействуют только соседние звенья, сворачивается в клубок, обладающий большим числом конформаций, переходы между которыми происходят в процессе микроброуновского движения частей цепи.

Такой клубок не обладает определенной внутренней структурой, он как бы все время «дышит», причем амплитуда «вздоха» порядка размеров клубка. Взаимное расположение отдельных частей клубка полностью подчиняется статистическим закономерностям. Однако если имеются объемные взаимодействия между атомами, далеко отстоящими друг от друга по цепи, то это существенно меняет всю картину. В реальных макромолекулах объемные взаимодействия элементов цепи создают внутреннее поле, под действием которого образуется глобула с плотной сердцевиной. В отличие от клубка глобула уже обладает определенной пространственной структурой. Сердцевина большой глобулы пространственно однородна с постоянной концентрацией звеньев, большей по сравнению с «опушкой» глобулы (рис. 8.1). Температурные переходы между состояниями

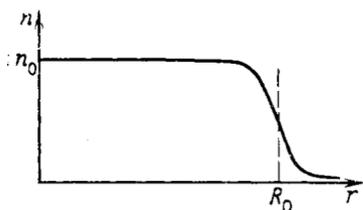


Рис. 8.1. Распределение плотности звеньев в глобуле в зависимости от расстояния от центра глобулы R_0 — радиус глобулы, n_0 — число звеньев

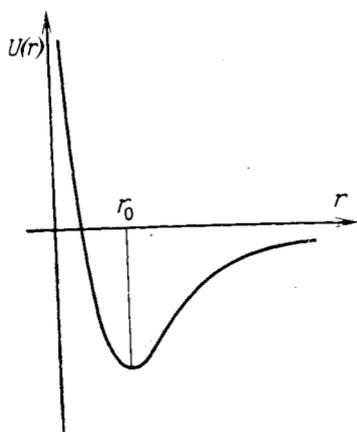


Рис. 8.2. Электронный терм $U(r)$ для двухатомной молекулы

клубка и глобулы одновременно являются переходами между разными фазами и сопровождаются изменениями агрегатного состояния макромолекулы. В биомacroмолекулах наиболее подробно эти процессы изучены в белках. Белковые глобулы претерпевают переходы порядок — беспорядок в относительно малом интервале температуры и напоминают в этом отношении фазовые переходы 1-го рода. В экспериментальных исследованиях на калориметрах к препарату белка обычно подводится тепло с постоянной скоростью и при этом регистрируется скорость повышения температуры белка. Отсюда можно найти теплоемкость белка при различных температурах. Оказывается, что при тепловой денатурации белка и переходах типа поря-

док—беспорядок происходит одновременно значительное изменение его теплоемкости ($\Delta C_p \sim 0,2—0,6 \text{ Дж} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$). Эти изменения не могут быть вызваны только термическим возбуждением внутримолекулярных степеней свободы, а свидетельствуют о структурных перестройках в самой макромолекуле. Детальный характер этих перестроек в белковой глобуле можно понять, зная конкретную природу объемных взаимодействий в белке.

Типы объемных взаимодействий. Первичная структура полимерной цепи определяется химическими или валентными взаимодействиями. Объемные взаимодействия в основном определяют вторичную структуру макромолекул. Общим критерием стабильности молекулярной структуры является наличие минимума на кривой $U(r)$ зависимости энергии взаимодействия от расстояния между взаимодействующими частями. На рис. 8.2 приведена кривая $U(r)$ с минимумом при $r=r_0$ в случае двух частиц (двухатомная молекула). На малых расстояниях преобладают силы отталкивания а на больших расстояниях превалирует притяжение. При $r=r_0$ силы притяжения и отталкивания уравновешивают друг друга. Значение энергии $U(r)$ свободных частиц при $r \rightarrow \infty$ равно нулю, а энергия образованной ими стабильной структуры отрицательна $U(r_0) < 0$. На малых расстояниях, где частицы отталкиваются, $U(r) > 0$. Минимум $U(r_0)$ соответствует максимальной по абсолютной величине и отрицательной по знаку энергии взаимодействия. В образовании вторичной структуры белка играют большую роль силы Ван-дер-Ваальса. Они имеют электромагнитную природу и связаны с взаимодействием электрических диполей в соседних молекулах. Наиболее распространены дисперсионные взаимодействия между молекулами, которые не обладают постоянными дипольными моментами. Природа этих сил носит квантовомеханический характер. Движение электрона как квантовой частицы, не может быть описано точной механической траекторией, а имеет «размытый» характер. Электрон не может обладать одновременно строго определенными значениями координаты (x) и импульса (p) ($p = mv$, произведение массы m на скорость v).

Неопределенности в значениях координаты Δx и импульса Δp связаны соотношением неопределенностей

$$\Delta x \cdot \Delta p \simeq h. \quad (8.1)$$

Это значит, что и в основном невозбужденном состоянии существуют быстрые смещения заряда электрона от положения равновесия, а следовательно, в молекуле в состоянии покоя появляются «мгновенные» дипольные моменты. Появление такого момента в одной молекуле индуцирует появление его в соседней молекуле. Возникает взаимодействие двух быстроменяющихся дипольных моментов, которые, таким образом, становятся связанными и притягиваются друг к другу. Энергия притяжения

двух мгновенных диполей, или энергия дисперсионного взаимодействия, быстро убывает с расстоянием

$$U_{\text{дисп}} \sim \frac{1}{r^6}. \quad (8.2)$$

Кроме дисперсионного взаимодействия возможно и электростатическое притяжение между постоянными диполями в полярных молекулах. Кроме того, существуют также индукционные взаимодействия, которые возникают между постоянным дипольным моментом в одной молекуле и наведенным им диполем в соседней поляризуемой молекуле. Суммарное ван-дер-ваальсово взаимодействие двух молекул зависит от вклада всех типов дипольных взаимодействий и составляет по величине от 1,0 до нескольких десятков ккал/моль. Для многих биологических макромолекул глубина энергетического минимума, создаваемого за счет ван-дер-ваальсового притяжения, составляет 1—3 ккал/моль, что по порядку величины сравнимо с величиной тепловой энергии 0,6 ккал/моль молекул при комнатной температуре ($RT = 2 \text{ кал} \cdot \text{К}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot 300, \text{ К} = 0,6 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$).

В выражении для полной энергии или полного потенциала взаимодействия нам необходимо учесть не только притяжение

$$(U_{\text{притяж}}(r) \sim \frac{1}{r^6}),$$

$$(U_{\text{отт}}(r) \sim \frac{1}{r^{12}}).$$

Сложение этих величин дает

$$U_{i, \kappa}(r) = \frac{A}{r^{6_{i, \kappa}}} + \frac{B}{r^{12_{i, \kappa}}}, \quad (8.3)$$

где A, B — константы притяжения и отталкивания, $r_{i, \kappa}$ — расстояние между взаимодействующими атомами (i и k). При заданных значениях A и B можно найти минимальное расстояние r_0 или положение минимума $U(r_0)$, на котором система из двух разных атомов или небольших атомных групп (CH_3, CH_2) устойчива. Так, для пар атомов углерода минимальное расстояние составляет 3,0 А, а для $\text{H} \dots \text{H}$ это $\sim 2,0$ А.

Наряду с силами Ван-дер-Ваальса большую роль в стабилизации биоструктур играют водородные связи и электростатические взаимодействия между заряженными и полярными группами. Водородные связи, например, стабилизируют вторичную структуру полипептидных цепей. В энергию водородной связи дают вклад электростатические взаимодействия, притяжение и отталкивание (8.3), а также энергия делокализации электронов.

Величины энергии водородной связи сильно варьируют (3—8 ккал/моль). Так, водородная связь



обладает энергией 8,6 ккал/моль.

Электростатические взаимодействия задаются формулой

$$U_{\text{эл.стат}} = - \sum \frac{q_i q_k}{\epsilon r_{ik}}, \quad (8.4)$$

где q_i, q_k — заряды на атомах (i и k), r_{ik} — расстояние между атомами, ϵ — диэлектрическая постоянная (для белков $\epsilon \sim 3,5$).

Внутреннее вращение и поворотная изомерия имеют важное значение в конформационной структуре макромолекулы. Энергия ближних взаимодействий атомных групп зависит от расстояний между ними, которые в свою очередь меняются при вращении этих групп вокруг единичных связей. При близком расположении валентно не связанные атомы начинают отталкиваться, и возникает тормозящий энергетический потенциал, препятствующий вращению атомных групп. Энергия вращения атомных групп вокруг единичных связей дает основной вклад в общую конформационную энергию полимерной цепи.

На рис. 8.3 видно, что молекула этана имеет минимум конформационной энергии в трансконформации и максимум — в цисконформации. Энергетический барьер, или тормозящий по-

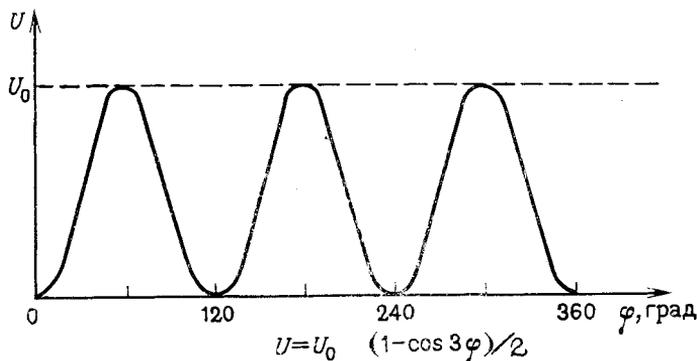


Рис. 8.3. График зависимости потенциальной энергии внутреннего вращения в этане от угла поворота. Значения углов 0° , 120° и т. д. соответствуют транс-, а 60° , 180° и цис-конформациям

тенциал, для перехода одной трансконформации в другую через цисформу при повороте вокруг С—С связи на 120° равен ~ 3 ккал/моль. Зависимость потенциала внутреннего вращения от угла поворота φ задается выражением

$$U(\varphi) = \frac{U_0}{2} (1 - \cos 3\varphi), \quad (8.5)$$

где U_0 — высота барьера.

Общая конформационная энергия полимера зависит от взаимных углов поворотов звеньев вокруг единичных связей. Подобная система, где энергия составляющих элементов зависит от их взаимодействия друг с другом, называется кооперативной.

Конформационная энергия полипептидной цепи определяется всеми видами объемных взаимодействий и зависит от энергии внутреннего вращения боковых цепей аминокислотных остатков вокруг единичных связей. Общее строение полипептидной цепи представлено на рис. 8.4. Как кажется на первый взгляд, вращение боковых групп может происходить вокруг

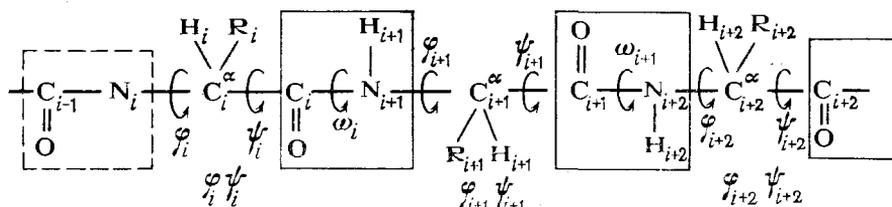
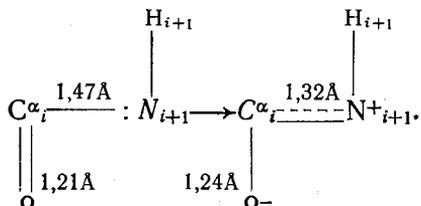


Рис. 8.4. Общее строение полипептидной цепи

всех единичных связей: $N_i - C_{\alpha_i}$ на угол φ_i , $C_{\alpha_i}C_i$ на угол ψ_i , $C_i - N_{i+1}$ на угол ω_i . В этом случае взаимное влияние звеньев при изменении их положения может передаваться вдоль цепи через большое число связей, и тогда вклад их в общую конформационную энергию трудно учесть. Однако на самом деле двойной характер пептидной связи $C_{\alpha_i}O - N_{i+1}$ препятствует вращению вокруг нее. Он обусловлен обобществлением неподеленной пары $2 S^2$ электронов атома азота между азотом и углеродом. Вследствие этого происходят выталкивание электрона углерода из двойной π -связи $C=O$ и локализация его на кислороде с частичным превращением связи $C=O$ в одиночную



Делокализация электронов между атомами N, C, O приводит к тому, что пептидная группа максимально стабилизируется, когда ее атомы, включая α -углеродные атомы соседних аминокислот, расположены в одной плоскости. Поэтому вращение вокруг пептидной связи $C_{\alpha_i} - N_{i+1}$ затруднено в силу ее

двойного характера. Мы можем теперь учитывать только вращение вокруг связей $N_i - C^{\alpha}_i$ (угол φ_i) и $C^{\alpha}_i - C_i$ (угол ψ_i), так как в такой цепи отсутствуют стерические перекрытия атомов i -й пептидной единицы с $(i+2)$ -й или $(i-2)$ -й единицами. Иными словами, в пептидной цепи имеет место только попарное кооперативное взаимодействие при вращении вокруг единичных связей, принадлежащих одному и тому же α -углеродному атому. Каждая пара углов (φ_i и ψ_i) может рассматриваться независимо, а кооперативность в цепи фактически ограничивается взаимодействием соседних пептидных единиц. Потенциалы внутреннего вращения U_0 вокруг единичных связей весьма малы ($\sim 1,0$ ккал/моль). Следовательно, минимумы отдельных дискретных состояний, возникающих при изменении углов φ и ψ , разделены невысокими барьерами. Общее выражение для конформационной энергии имеет вид

$$U(\varphi, \psi) = \sum_{i,k} U_{i,k}(\varphi, \psi) + \frac{U_0^{\varphi}}{2}(1 - \cos 3\varphi) + \frac{U_0^{\psi}}{2}(1 - \cos 3\psi) + U_{\text{эл.стат}}, \quad (8.6)$$

где $U_{i,k}(\varphi, \psi)$ определяется потенциалом (8.3) с расстоянием $r_{i,k}$, зависящим от углов φ и ψ . $U_{\text{эл.стат}}$ задается формулой (8.4). Было проведено определение конформационной энергии (8.6) для простейших остатков метиламидов N-ацетил- α -аминокислот ($\text{CH}_3\text{-CONH-CHR-CONH-CH}_3$), где R — радиал боковой цепи аминокислотного остатка.

На рис. 8.5 представлена диаграмма поверхности конформационной энергии в функции углов φ и ψ молекулы N-ацетил-L-аланина. Видны четыре области низкой энергии с неглубокими минимумами 1—2 ккал/моль. Данные расчета структуры сов-

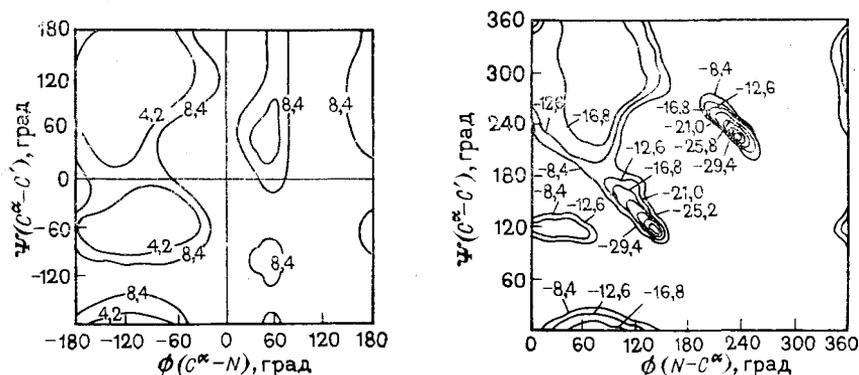


Рис. 8.5. Диаграмма потенциальной поверхности молекулы метиламида — N-ацетил — L-аланина. Цифры указывают энергию конформации в КДж/моль

падают с другими экспериментальными результатами. Таким образом, конформация простейших фрагментов полипептидной цепи может быть найдена путем расчета. Для этого необходимо знать химическую последовательность аминокислотных остатков и подсчитать энергию невалентных взаимодействий их атомов и атомных групп по формуле (8.6). Найденная в результате конформация задается в виде конкретных значений углов поворота атомных групп и соответствующих расстояний между ними, при которых конформационная суммарная энергия, зависящая от всех видов объемных взаимодействий, достигает минимальных значений.

Конформационная энергия белка, включающего многие сотни остатков, не может быть найдена таким путем из-за больших математических трудностей. В этом случае уже нельзя непосредственно рассчитать вторичную и тем более третичную структуру больших участков белка, зная первичную последовательность. Для решения этой проблемы сейчас пользуются эмпирическим методом, который основан на многочисленных экспериментальных данных по корреляции между вторичной структурой участка белка и его первичной аминокислотной последовательностью. На основании этих корреляций сформулированы эвристические принципы пространственного строения белка и правила сворачивания пептидной цепи с образованием вторичной и третичной структур.

Общая топография белковой глобулы определяется тем, что полярные группы расположены в основном на поверхности, а неполярные находятся внутри глобулы и образуют ее гидрофобное ядро. На поверхностях основных элементов вторичной структуры α -спиралей и β -структур также имеются целые гидрофобные области. Внутримолекулярные водородные связи между пептидными группами максимально насыщены и стабилизируют глобулу.

Кроме этих топологических принципов существуют еще обширные статистические данные о частотах появления каждого аминокислотного остатка из первичной последовательности в α - и β -элементах вторичной структуры. С помощью эмпирических правил удается примерно в половине случаев предсказать, какова будет вторичная структура белка при заданной первичной последовательности. Различные типы белковых структур составляют структурную (рис. 8.6) иерархию, которая, по-видимому, отражает и последовательность стадий сворачивания белка из первичной полипептидной цепи. Уже на самых ранних стадиях сворачивания в развернутой цепи образуются α - или β -участки вторичной структуры за счет локальных взаимодействий. Затем эти участки стабилизируются в результате действия гидрофобных сил, водородных связей и объемных взаимодействий с другими участками цепи с образованием уже третичной структуры. Самосборка структуры белка носит направленный кооперативный характер. Она протекает через опреде-

ленное число промежуточных стадий, а не путем перебора всех возможных вариантов укладки до достижения минимального по энергии состояния. На такой «статистический» способ сворачивания потребовалось бы время неизмеримо большее, чем реальное время сворачивания белковой глобулы (несколько секунд).

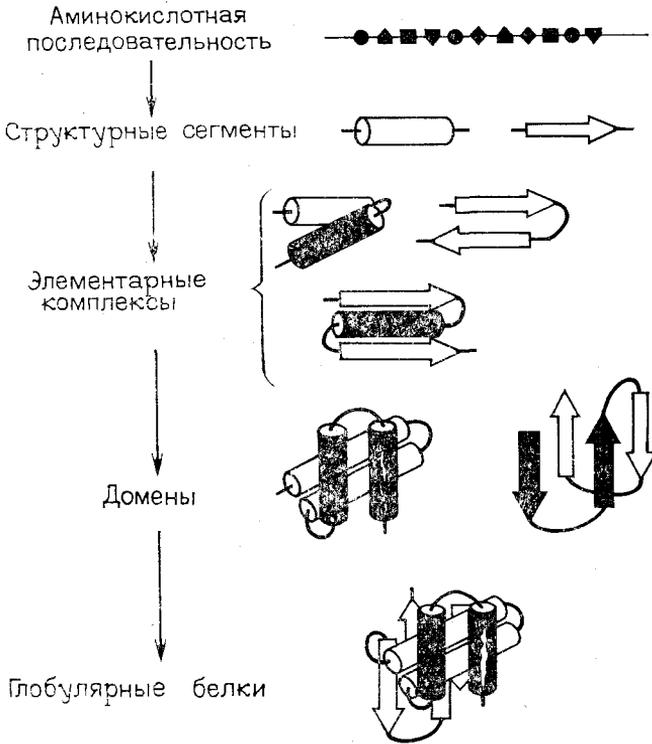


Рис. 8.6. Иерархия структуры белка и последовательность его сворачивания

Выгодные низкоэнергетические состояния появляются сразу на ранних этапах сворачивания в небольших участках цепи, включающих два-три остатка, а средние и дальние взаимодействия их не только не «портят», но стабилизируют. Эти представления можно использовать для того, чтобы упростить метод расчета низкоэнергетической конформации белка. Вместо того чтобы пытаться сразу найти минимальную по энергии конформацию для всей цепи, находят вначале низкоэнергетические состояния дипептидов. Низкоэнергетические формы трипептидов представляют собой комбинации низкоэнергетических форм смежных дипептидов, что является результатом согласованно-

сти три- и дипептидных взаимодействий. Конформационный анализ более сложных олигопептидов проводится методом последовательного увеличения цепи на один остаток. Важно, что новые взаимодействия, возникающие при удлинении цепи, стабилизируют фрагмент и не нарушают уже сложившихся взаимодействий и низкоэнергетических форм. В настоящее время такой полумпирический метод расчета дает возможность определить пространственную структуру достаточно сложных полипептидов, включающих до сотни остатков. Например, была рассчитана структура молекулы бычьего панкреатического трипсинового ингибитора, включающей 58 аминокислотных остатков с заданной первичной последовательностью. Однако расчеты более сложных полипептидов потребуют привлечения уже независимых стерических предположений о возможной структуре белка.

Состояние воды в биополимерах. Мы уже говорили, что общая топология белковой глобулы определяется гидрофобными взаимодействиями, которые имеют чисто термодинамическую природу. Неполярные углеводороды разрушают ячеистую структуру воды, что приводит к повышению энтропии ($\Delta S > 0$) и, следовательно, к уменьшению свободной энергии системы

$$\Delta F = \Delta U - T \Delta S, \text{ где } \Delta S > 0.$$

Однако разрушение структуры воды нарушает систему водородных связей между молекулами воды. Вместо водородных связей углеводороды способны образовывать только более слабые ван-дер-ваальсовы связи с водой. Это приводит к увеличению значений $\Delta U > 0$, которые по абсолютной величине превышают отрицательный энтропийный вклад в изменение ΔF , т. е. $\Delta U > |T \Delta S|$. Поэтому в целом ΔF повышается, что энергетически невыгодно, и приводит к выталкиванию углеводородов из водной фазы. Гидрофобные взаимодействия в целом стабилизируют макромолекулы, хотя детальная картина взаимодействий с водой в пределах макромолекулы значительно сложнее. Сами молекулы воды распределены в глобуле неоднородно. Снаружи глобулы имеются локальные полярные центры гидратации, где молекулы воды сильнее связаны по сравнению с тонкой гидратной оболочкой на поверхности глобулы. В целом около поверхности белка может удерживаться до 2—3 слоев воды. Кроме того, имеется фракция прочно связанной воды, которая фиксируется на соответствующих малоподвижных элементах белковой структуры.

Влияние воды на конформационную энергию пептидов существенно не изменяет положения энергетических минимумов на конформационной карте. Вода может оказывать сильное влияние на стабильность отдельных конформационных участков и тем самым на внутримолекулярную подвижность белка. Известно, что при увеличении степени гидратации высушенных препаратов ферментов увеличение их активности происходит

резко в узком диапазоне увеличения числа молекул воды (10—20) на одну молекулу белка. В этой области происходит растормаживание определенных внутримолекулярных степеней свободы, нужных для обеспечения ферментативной активности. Можно рассматривать систему белок—вода как единую кооперативную систему, где изменения в состоянии как растворителя, так и белка носят взаимосвязанный характер.

Уникальность структуры белка. Белок обладает определенной плотной структурой, которая образуется из первичной аминокислотной последовательности в результате согласованного характера ближних и дальних взаимодействий. В этом смысле структура белка уникальна. Возникает вопрос, в какой степени первичная последовательность однозначно определяет топологию и функциональные свойства белковой глобулы?

Известно, что белки, выполняющие одинаковые функции в разных организмах, отличаются по своей первичной последовательности (например, цитохромы). Однако третичные структуры у них сходны. Но есть белки, обладающие сходными третичными структурами, но выполняющие различные функции. Оказалось также, что способностью формировать α - и β -участки с непрерывными гидрофобными поверхностями обладают не только природные, но и случайные аминокислотные последовательности полярных и неполярных групп. Таким образом, для получения плотной упаковки белка нет необходимости абсолютно однозначно задавать его первичную последовательность, хотя функциональные свойства белка определяются сравнительно небольшим числом активных групп. И здесь уже ситуация совершенно иная. В активном центре белка (фермента), где имеются, как правило, 5—6 остатков, нельзя заменить ни одного из них без нарушения функциональных свойств. Поэтому комбинация незаменимых остатков в активном центре белка должна воспроизводиться совершенно однозначно при обязательном сохранении лишь общих топографических черт глобулярной пространственной структуры.

Теперь, пользуясь формулами теории информации (6.2—6.3), можно оценить вероятность случайного одноактного синтеза белка. Вначале найдем количество информации, содержащейся в активном центре с аминокислотными остатками, число которых $n=5-6$. Общее число способов W , которыми конструируют такой активный центр, выбрав из 20 аминокислот нужные нам 5—6, составляет, очевидно, $W=20^n=20^5-20^6$. В таком центре содержится количество информации, равное $I=\log_2 W$:

$$I = \log_2 20^n = 4,3 \cdot N = 20-30 \text{ бит.}$$

Очевидно, это самое минимальное количество информации, необходимое для синтеза белка. На самом деле незаменимы в белке также и отдельные его характерные участки, которые содержат, как правило, не менее $N=20-25$ аминокислот. Тогда

количество биологически уникальной информации в белке будет уже больше. Оно составит величину

$$I_B = \log_2 20^N \approx 4,3 \cdot N \approx 90-100 \text{ бит.}$$

Вероятность случайного одноактного синтеза такой структуры очень мала:

$$P = \frac{1}{W} = 2^{-I_B} = 2^{-(90-100)} \sim 10^{-30}.$$

Это значит, что создание емкой информационной системы белка не могло произойти в один акт, а осуществляется постепенно с обязательным закреплением синтезированных элементов структуры в процессах воспроизведения.

Особенности пространственной организации нуклеиновых кислот. В отличие от белков структура ДНК более стабильна. Тепловые флуктуации не приводят к разрыву водородных связей и не меняют межплоскостные расстояния между основаниями. В моделях жесткость служит основным параметром. Двойная спираль ДНК обладает общей жесткостью по длине спирали и одновременно ограниченным числом вращательных степеней свободы вокруг единичных химических связей. Все конформации ДНК относятся либо к *A*-, либо к *B*-формам. В случае *B*-форм ось спирали проходит через пары оснований вблизи их центра тяжести, а в *A*-форме в центре остается отверстие около 4 Å, а основания отеснены к периферии молекулы. Ос-

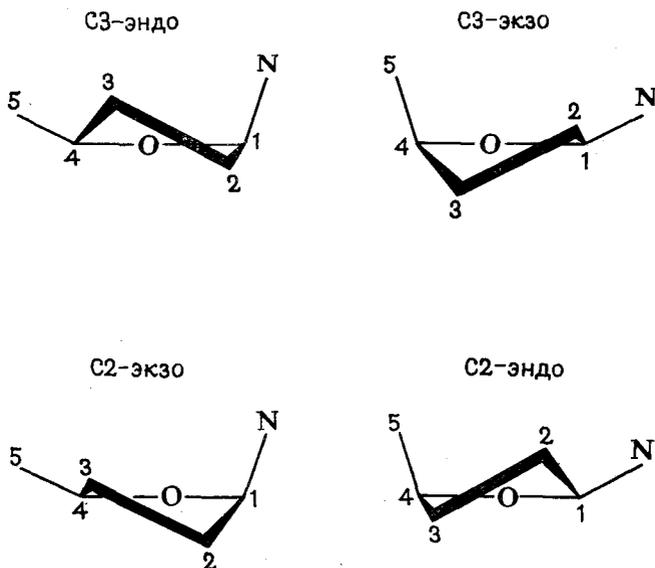


Рис. 8.7. Формы спирали ДНК: четыре наиболее устойчивые конформации сахарного кольца в нуклеотиде

новая трудность полного описания энергетически разрешенных конформаций двойных спиралей состоит в чрезвычайно большом наборе всех структурных вариантов.

Конформация мономера нуклеиновой кислоты задается конформацией сахарного кольца, пятью двугранными углами вращения вокруг единичных связей в сахарофосфатной цепи и одним углом χ , определяющим ориентацию основания относительно сахарного кольца. Различие *A*- и *B*-форм состоит в том, что у *A*-формы отличаются значения угла χ и угла поворота τ между соседними парами, а также большие значения расстояния *D* пары от оси спирали (рис. 8.7). Кроме того, альтернативная геометрия сахарного кольца у *A*- и *B*-форм определяется тем, какой из атомов углерода выдвинут из плоскости сахарного кольца. Наличие столь большого числа внутренних степеней свободы позволяет рассматривать процесс изменения конформации двойной спирали как непрерывный. Однако можно ограничиться лишь «разумными» взаимоположениями пар оснований. Тогда оказывается, что для регулярной спирали существует только ограниченное число конформаций сахарофосфатного остова. Расчеты показывают, что энергия *A*-форм в целом выше, а ширина энергетической ямы уже, чем у *B*-форм. Это является следствием того, что расстояние между одноименно заряженными фосфатами одной и той же цепи примерно на 1 Å короче в *A*-формах. Полный учет всех взаимодействий показывает, что *B*-форма является единственной устойчивой формой ДНК.

В последние годы получены данные о существовании так называемой *z*-формы ДНК, в которой спираль с антипараллельными нитями закручена влево, а повторяющаяся единица содержит не один, а два нуклеотида.

Лекция 9. ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА БЕЛКОВ

Зависимость функциональных свойств белков от их конформационного состояния давно известна в биохимии. Однако остается неясным, под влиянием каких сил и механизмов изменяется это состояние и какую роль оно играет в обеспечении их активности. В современной молекулярной биофизике центральное место занимает проблема механизма и функциональной роли внутримолекулярной подвижности биополимеров, прежде всего белков.

Решение этой проблемы предусматривает получение количественных характеристик подвижности отдельных частей и атомных групп и сопоставление их с функциональным состоянием молекулы белка при различных условиях (температура, pH, ионная сила). Поскольку белок обладает гетерогенной пространственной организацией, подвижность его отдельных структурных единиц будет различной по своим характерным временам и амплитудам смещений. Кроме того, глубокие конформационные перестройки всей молекулы белка не могут происходить сразу, а складываются из локальных микроинформационных смещений отдельных атомных групп. В итоге они приводят уже к направленным перестройкам всей конструкции молекулы белка вследствие взаимного смещения его отдельных частей по определенным детерминистским степеням свободы. Приведем в качестве примера последовательных, функционально значимых перестроек в белке конформационные изменения гемоглобина (Hb). Присоединение кислорода к атому железа Fe^{+2} приводит к смещению его на $0,7 \text{ \AA}$ в плоскость гемовой группы. Это первичное микроинформационное смещение индуцирует в Hb каскад последовательных перестроек. Они включают смещение гистидина к центру молекулы, смещение субъединиц с перестройкой системы водородных связей. При этом меняется и конформация самих α - и β -субъединиц. После оксигенации первых двух α -субъединиц облегчается присоединение следующих молекул кислорода к остальным субъединицам, сродство которых к кислороду увеличивается в несколько сот раз. В этом и состоит функционально направленный смысл кооперативных конформационных перестроек в Hb. Физическая причина их состо-

ит в том, что первоначальное равновесие сил необратимо нарушается в результате акта присоединения кислорода к Fe^{2+} . В молекуле Hb должна установиться новая равновесная оксиконформация, которой уже соответствует другое взаимное расположение атомных групп. Процесс достижения этой конечной равновесной оксиконформации происходит через ряд последовательных стадий как релаксация исходной дезоксиформы, ставшей неравновесной из-за быстрого присоединения кислорода. Непосредственное изучение быстрых внутренних движений в молекуле белка стало возможным лишь в последние годы, благодаря внедрению современных физических резонансных методов радиоспектроскопии (электронный парамагнитный, ядерный магнитный, ядерный гамма-резонансы, методы люминесценции). Остановимся кратко на физической сущности этих методов и получаемой с их помощью информации.

Основной экспериментальный подход состоит в том, чтобы, изучая определенные физические параметры (люминесцентные, парамагнитные) специально внедренных во внутрь белка низкомолекулярных соединений, получить характеристику подвижности окружающей их среды, т. е. характеристику внутримолекулярной подвижности белка.

Люминесцентные методы позволяют измерять внутримолекулярную подвижность белка, изучая, как зависит от температуры положение максимума люминесценции введенной в белок метки максимума либо собственной люминесценции триптофана белка. При поглощении кванта света люминесцирующей молекулой один из двух π -электронов переходит на возбужденный синглетный уровень S_1 (рис. 9.1), а вся молекула при этом переходит в синглетное возбужденное состояние. При переходе в возбужденное состояние запас колебательной энергии молекулы кратковременно повышается, а затем за время 10^{-11} — 10^{-12} с происходит диссипация колебательной энергии и релаксация на нижние колебательные подуровни того же самого электронного состояния S_1 . В возбужденном состоянии S_1 молекула живет $\tau^* = 10^{-8}$ — 10^{-9} с, после чего она может вновь вернуться на основной уровень S_0 либо с испусканием кванта флуоресценции, либо безызлучательно, рассеивая в тепло энергию электронного возбуждения. За время τ^* существования состояния S_1 спин электрона на уровне S_1 может изменить свою ориентацию на противоположную. Тогда он станет параллельным спину оставшегося

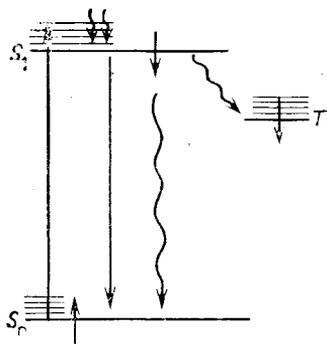


Рис. 9.1. Схема переходов между синглетными (S_1 , S_0) и триплетными (T) состояниями молекулы

ранее спаренного с ним π -электрона. В этом случае происходит переход молекулы в триплетное состояние $S_1 \rightarrow T$, в котором спины электронов на S_0 - и T -уровнях параллельны (рис. 9.1). Переход в основное состояние $T \rightarrow S_0$ теперь также требует переориентации спинов вновь на антипараллельную. Поэтому вероятность $T \rightarrow S_0$ перехода мала, а время жизни состояния T велико по сравнению с состоянием S_1 и составляет $10^{-6} - 10^{-2}$ с и больше. С триплетного уровня молекула переходит на основной с испусканием света фосфоресценции. При нахождении в возбужденном состоянии S_1 или T в молекуле изменяется электрический дипольный момент, влияющий на диполи окружающей среды. За время жизни молекулы в возбужденном состоянии диполи среды могут успеть переориентироваться в соответствии с полем возбужденного диполя. Это произойдет, если время дипольной релаксации окружающей среды τ_p много меньше времени τ^* возбужденного состояния ($\tau_p \ll \tau^*$). Тогда соответственно будет понижен энергетический уровень возбужденной молекулы, а максимум ее спектра флуоресценции сдвинется в длинноволновую область. Если же $\tau_p \gg \tau^*$, то переориентация диполей среды не успеет произойти, т. е. в этом случае окружение флуоресцирующей молекулы жесткое и не влияет на положение максимума полосы ее флуоресценции. Ценную информацию о внутримолекулярной подвижности белков получают, изучая таким путем собственную флуоресценцию триптофана. Положение максимума его флуоресценции сильно зависит от подвижности диполей среды и может варьировать до 30 нм. В сложной системе белка время реорганизации окружающей триптофан среды может быть больше времени его электронного S_1 -возбуждения ($\tau^* \sim 5$ нс), особенно при низких температурах. Действительно, оказалось, что снижение температуры в диапазоне от 0° до -20° приводит к сдвигу на 5—12 нм, а в диапазоне температур от -20° до -90° к сдвигу на 4—9 нм положения максимума флуоресценции триптофана в коротковолновую сторону спектра. Это говорит о замораживании движений в белковой матрице в наносекундной области. Высушенные белки не дают этих спектральных сдвигов, что свидетельствует о необходимости присутствия в структуре белка воды для обеспечения его подвижности. Система белок — вода замерзает как единая микрофаза. Если вводить в белок экзогенные фосфоресцирующие метки (например, производные эозина), то таким способом можно оценивать более длинные характерные времена структурных перестроек (до 1 с). Оказалось, что в глубоких слоях белковых макромолекул происходят медленные движения $\tau_p \sim 1$ с, а в более поверхностных слоях эти движения существенно быстрее: $\tau_p \sim 10^{-3}$ с. Надо ясно понимать, что найденные времена характеризуют подвижность только ближайшего микроокружения люминесцирующего хромофора и не могут распространяться на всю макромолекулу. Число и места локализации таких люминесцирующих меток в бел-

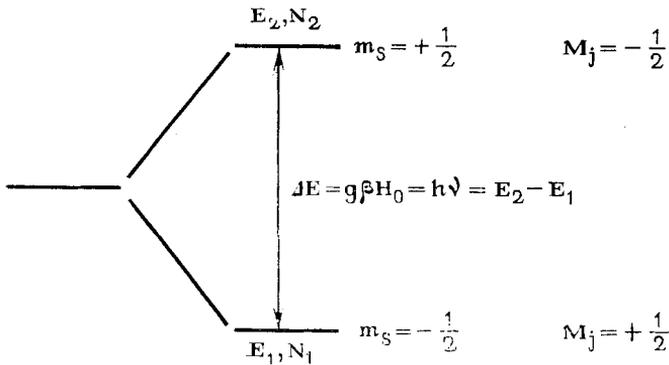


Рис. 9.2. Расщепление энергетических уровней электрона (протона) в магнитном поле (H)

ке зависят их от химических особенностей и от характера взаимодействия с белковыми группами.

Методы радиоспектроскопии включают главным образом метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Физические основы этих методов достаточно сложны и подробно изложены в специальных руководствах и учебниках. Здесь мы кратко остановимся лишь на тех вопросах, которые необходимы для понимания их применения в биофизике. Как электроны, так и ядра атомов обладают собственным магнитным моментом, или спином. Если систему таких спинов поместить в постоянное внешнее магнитное поле \vec{H}_0 , то спины будут ориентироваться вдоль поля. Энергетический уровень расщепится на два уровня. Энергия электрона со спином $S = \frac{1}{2}$ будет теперь зависеть от того, параллельно (верхний уровень) или антипараллельно (нижний уровень) направлению поля \vec{H}_0 расположены спины (рис. 9.2). Соответственно нижний уровень займут ядра протона (спин $1/2$ с антипараллельным, а верхний уровень — с параллельным полю \vec{H}_0 направлением спинов (рис. 9.2)).

Разность энергетических уровней составляет величину

$$E_2 - E_1 = \Delta E = g \beta H_0. \quad (9.1)$$

В формуле (9.1) g — постоянная величина, так называемый g -фактор электрона или ядра, который для свободного электрона равен 2,0023, а для ядра протона — 5,58. Величина β — магнетон Бора, равный для электрона $\sim 10^{-21}$ эрг/Гс, или ядер-

ный магнетон $\beta_N = 5 \cdot 10^{-24}$ эрг/Гс. На нижнем уровне E_1 заселенность (N_1) частиц больше, чем на верхнем (N_2), причем, отношение заселенностей зависит от разности энергий $\Delta E = E_2 - E_1$:

$$\frac{N_1}{N_2} = e^{g\beta H_0/k_B T} = e^{\Delta E/k_B T}. \quad (9.2)$$

Наложим теперь на эту систему помимо постоянного \vec{H}_0 и переменное магнитное поле с частотой ν , перпендикулярное постоянному полю. Тогда в системе будут индуцироваться вынужденные переходы между двумя уровнями: $N_1 \rightarrow N_2$ и $N_2 \rightarrow N_1$. Но поскольку исходно $N_1 > N_2$, то число переходов с нижнего уровня на верхний $N_1 \rightarrow N_2$ превзойдет число обратных переходов $N_2 \rightarrow N_1$. В результате будет происходить резонансное поглощение энергии переменного поля при условии

$$h\nu = g\beta H_0. \quad (9.3)$$

При величине внешнего поля $\vec{H}_0 = 10^4$ Гс резонансная частота для свободного электрона равна $\nu_e = 2,8 \cdot 10^{10} \text{ с}^{-1}$, а для протонного ядерного резонанса она намного меньше: $\nu_H = 2,26 \times 10^7 \text{ с}^{-1}$. На рис. 9.3 изображены линия поглощения переменного поля и ее первая производная (сигнал ЭПР) в зависимости от величины постоянного магнитного поля H_0 . Обычно устанавливают постоянную частоту ν переменного поля, а затем плавно меняют внешнее постоянное поле до достижения тех значений H_0 , при которых наблюдается резонансное поглощение (9.3).

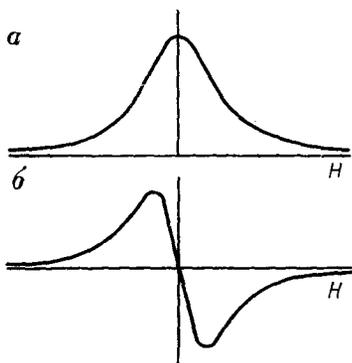


Рис. 9.3. Линия поглощения СВЧ — поля (а) и ее первая производная (б)

Как видно из рис. 9.3, сигнал ЭПР обладает не узкой линией, а полосой поглощения с определенной шириной. Это значит, что на самом деле сами энергетические уровни спинового состояния несколько размыты, т. е. обладают определенной шириной Γ . Основная причина этого состоит в том, что взаимодействие с внешними магнитными полями не является единственным процессом обмена энергией в системе ориентированных спинов. Она не изолирована, а взаимодействует также и с окружающей средой, передавая свою энергию со средним временем T_1 . Этот процесс препятствует выравниванию заселенностей N_1 и N_2 под действием переменного поля. Существуют и другие процессы

обмена энергией в самой системе спинов, которые влияют друг на друга и изменяют энергии спиновых состояний. Спин-спиновые взаимодействия создают дополнительные локальные магнитные поля в местах расположения соседних спинов и тем самым меняют строгое условие резонанса (9.3), уширяя общую линию поглощения. Процессам спин-спинового взаимодействия соответствует время T_2 , в течение которого сохраняется относительная энергия данного спинового состояния. Очевидно, время T_2 сохранения спинового состояния тем больше, чем меньше спин-спиновое взаимодействие. Описанные релаксационные процессы распада исходных спиновых состояний приводят к тому, что положение энергетического уровня спинов становится несколько неопределенным и характеризуется шириной Γ .

В квантовой механике связь между временем τ существования данного состояния и шириной Γ его точного энергетического уровня (E_0) дается соотношением неопределенностей для энергии

$$\Gamma \cdot \tau \sim \hbar, \quad (9.4)$$

где \hbar — постоянная Планка h , деленная на 2π ($\hbar = h/2\pi$). Таким образом, истинное положение энергетического уровня (E_0) состояния электрона в системе с временем релаксации T_1 может быть определено по положению линии резонанса с точностью до \hbar/T_1 ($E_0 \pm \frac{\hbar}{T_1}$). При $\tau \rightarrow \infty$ ширина $\Gamma \rightarrow 0$ и энергия E_0 находится точно. В общем случае ширина линии резонанса определяется как

$$\Delta H \cong \frac{1}{2T_1} + \frac{1}{T_2}. \quad (9.5)$$

Для свободных радикалов $T_1 \gg T_2$ и ширина линии ЭПР зависит в основном от времени T_2 :

$$\Delta H \sim \frac{1}{T_2}. \quad (9.6)$$

Нас интересует вопрос, каким образом связана ширина с характером внутримолекулярной динамики в исследуемом образце? Если вязкость в образце мала, то за счет быстрых молекулярных движений взаимные влияния спинов успевают усредниться при поглощении переменного поля. В этом случае резонанс наблюдается при усредненной линии с уменьшенной шириной. Наоборот, замораживание раствора и уменьшение его вязкости вновь замедляют молекулярные движения. Тогда при поглощении энергии переменного поля спины успевают по-

чувствовать влияние разных локальных полей в своем микроокружении, что уменьшит время T_2 сохранения спинового состояния и вызовет уширение общей линии резонанса. Таким образом, измеряя ширину линии поглощения, можно получить данные о характере внутримолекулярных движений в микроокружении спиновой частицы (радикал, протон). В методе спиновых меток к функциональной группе белка присоединяют свободный радикал, дающий сигнал ЭПР. Характеристики сигнала ЭПР являются показателем подвижности микроокружения этого радикала. Наиболее удобны нитроксильные метки, содержащие свободнорадикальную группу $N-\dot{O}$, где неспаренный электрон фактически делокализован между атомами N и O . Сигнал ЭПР этой метки имеет определенную структуру, которая обусловлена влиянием магнитного момента ядра азота на неспаренный электрон наряду с действием на него внешнего магнитного поля. Вращение нитроксильного радикала относительно направления внешнего поля изменяет структуру сигнала ЭПР. Существуют методы расчета, которые позволяют по параметрам сигнала ЭПР оценить характерное время τ_c вращения метки. Оказалось, что время вращения метки зависит от глубины ее погружения в слои белковой глобулы. В наружном водном слое значения τ_c составляют $10^{-11} - 10^{-10}$ с. Поверхностные слои характеризуются значениями $\tau_c \sim 10^{-10} - 10^{-8}$ с и, наконец, в глубоких слоях плотного гидрофобного ядра глобулы $\tau_c \sim 10^{-8} - 10^{-7}$ с. Было обнаружено также резкое увеличение ферментативной активности высушенных препаратов реакционных центров фотосинтеза при их увлажнении, которое коррелирует с одновременным падением значений τ_c спин-метки. Это говорит об изменении динамического состояния и одновременном появлении внутримолекулярной подвижности и функциональной активности белка.

Метод ЯМР. Изучение динамики белковых структур методом ЯМР основано на измерении времени релаксации T_1 и T_2 по ширине линии резонанса. На основе этих данных удается найти значения τ_c для ядер, на которых наблюдается резонанс.

Изучая протонный резонанс, можно в принципе оценить подвижность белковых групп, в состав которых входят «резонирующие» протоны. Метод ЯМР позволяет изучать определенные виды внутримолекулярного движения в белках. Так, температурные измерения времени T_1 в сывороточном альбумине обнаруживают вращения метильных групп с временами $\tau_c 10^{-10}$ с при -100° наблюдаются более медленные движения $\tau_c \sim 10^{-8}$ с (возможно, осцилляции полипептидной цепи). По времени T_2 для протонного резонанса удается определить три характерных диапазона времен τ_c : медленное вращение глобулы как целого ($\tau_c \sim 10^{-5}$ с), внутренние движения ($\tau_c \sim 10^{-5} - 10^{-6}$ с), движение внешних наиболее подвижных групп белка ($\tau_c \sim 10^{-10}$ с). Метод ЯМР дает важную информацию и о химической струк-

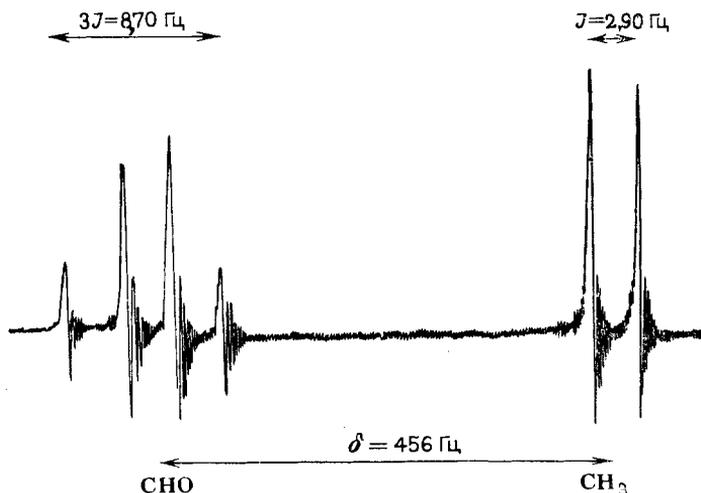


Рис. 9.4. Спектр ЯМР ацетальдегида CH_3CHO . Магнитное поле увеличивается слева направо. J — величина сверхтонкого расщепления

туре молекулы. Она проявляется в результате разного влияния локальных полей соседних ядер на положение полосы резонанса отдельных протонов, занимающих различные места в структуре молекулы. Вследствие этого у разных протонов резонанс появляется на разных частотах. Это явление называется химическим сдвигом. Кроме того, структура ЯМР так же, как и в случае ЭПР, отражает тонкие эффекты влияния магнитных моментов ядер, передающиеся через электронные связи в молекуле.

На рис. 9.4 приведен спектр протонного резонанса ацетальдегида $\text{CH}_3\text{—CHO}$. Видны две группы линий от трех протонов метильной и от одного протона альдегидной химических групп в молекуле. Эти две группы разделены химическим сдвигом. Кроме того, видно расщепление каждой из групп на отдельные линии вследствие влияния друг на друга магнитных моментов соседних ядер. Следует заметить, что подобная расшифровка спектров ЯМР от белковых молекул затрудняется их сложным характером и перекрыванием основной массы резонансных линий от протонов. Сейчас широко используются данные по резонансу на ^{31}P , а также на ^{13}C , линии которого находятся в стороне от основной массы перекрывающихся линий.

Метод ядерной гамма-резонансной (ЯГР) спектроскопии дает важную информацию о динамике белков. В отличие от

методов ЭПР и ЯМР он дает не только временные, но и амплитудные характеристики движений в белке. Метод позволяет определять средние величины смещений атомов в структуре белка, которые происходят в течение коротких времен $10^{-7} - 10^{-9}$ с. Метод основан на резонансном поглощении γ -квантов тяжелым ядром атома, например ядром изотопа ^{57}Fe , который содержится в природных соединениях в количестве 2,2%. Энергия γ -кванта, поглощенного ядром изотопа ^{57}Fe , составляет $\Delta E = 0,0144$ мэВ, а время жизни ядра ^{57}Fe в возбужденном состоянии $\tau^* \sim 10^{-7}$ с. Отсюда, пользуясь соотношением неопределенностей для энергии (9.4), найдем, что естественная ширина линии поглощения γ -квантов очень мала: $\Gamma \sim 10^{-8}$ эВ. Однако в реальных условиях резонансная частота поглощения γ -квантов ядром не совпадает с частотой самого γ -кванта. Дело в том, что при поглощении γ -кванта ядром ^{57}Fe часть энергии кванта превращается в кинетическую энергию отдачи, т. е. в поступательную энергию движения самого ядра. Это значит, что на самом деле энергия γ -кванта, используемая для непосредственного возбуждения ядра ^{57}Fe , будет уменьшена на величину, равную энергии отдачи. В результате резонансная частота поглощения сместится по сравнению с исходной частотой самого γ -кванта. Поскольку естественная ширина линии очень мала ($\Gamma \sim 10^{-8}$ эВ), а энергия отдачи для свободного ^{57}Fe намного больше $2 \cdot 10^{-3}$ эВ, то этот сдвиг будет очень заметен. Реальная величина энергии отдачи зависит от способности ядра атома ^{57}Fe воспринять импульс отдачи, а это в свою очередь определяется его собственной подвижностью. В твердых телах возможно поглощение γ -квантов без отдачи, когда энергию отдачи берет на себя весь кристалл в целом, а смещений ядра ^{57}Fe вообще не происходит. Этот эффект поглощения γ -квантов без отдачи называется эффектом Мессбауэра. В этом случае в спектрах поглощения γ -квантов появляются линии, не смещенные по энергии из-за отсутствия отдачи. С ростом среднеквадратичного смещения \bar{x}^2 , мессбауэровского ядра ^{57}Fe вероятность f' поглощения без отдачи γ -кванта падает. Наоборот, при малых \bar{x}^2 не происходит передачи энергии ядру, жестко связанному с окружением, и вероятность f' приближается к единице. Зависимость вероятности поглощения без отдачи от \bar{x}^2 носит экспоненциальный характер:

$$f' = e^{-\bar{x}^2/\lambda}, \quad (9.7)$$

где $\lambda = \lambda/2\pi$, λ — длина волны γ -кванта ($\lambda = 0,13$ Å для ^{57}Fe).

Измеряя вероятность поглощения без отдачи в различных условиях температуры и влажности, можно оценить величину смещения ядра мессбауэровского атома, т. е. получить ампли-

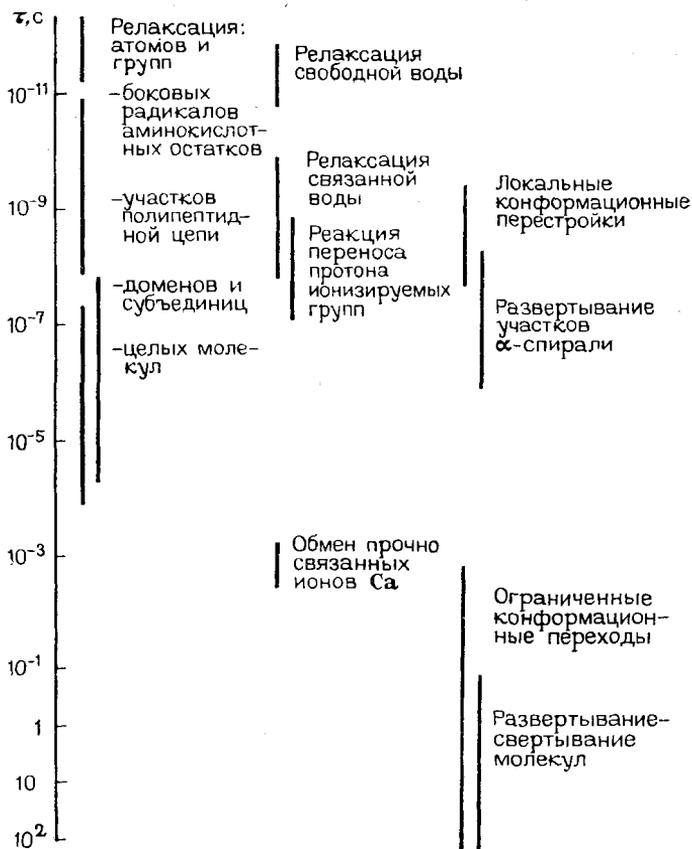


Рис. 9.5. Схема характеристических времен подвижности белков

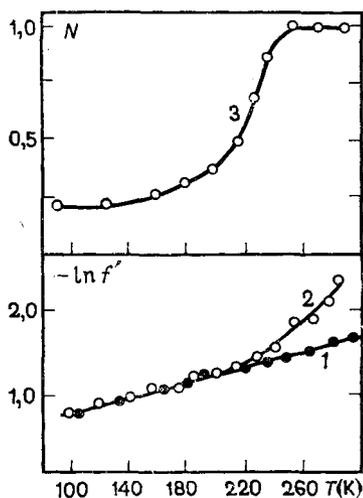


Рис. 9.6. Температурная зависимость вероятности эффекта Мессбауэра ($-\ln f'' = \langle x^2 \rangle$): 1 — сухой белок; 2 — влажный белок; 3 — функциональная активность N по переносу электрона в бактериальных реакционных центрах

помощью метода ЯГР измеряется смещение мессбауэровского ядра, которое атом успевает пройти за время 10^{-7} с. Ясно, что на других временах регистрации амплитуды смещений будет другими. Общая классификация подвижности элементов структуры белка по характерным временам отдельных видов движений приведена на рис. 9.5.

гудную характеристику его подвижности. Нормальный белок обладает характерной температурной зависимостью $f'(T)$ с изломом, что говорит о кооперативном характере размораживания внутренней подвижности при температурах излома. Сухой белок такими свойствами не обладает, а скорее напоминает обычное твердое тело, где увеличение \bar{x}^2 с температурой носит монотонный характер. При температурах 77—200 К мессбауэровские ядра колеблются с малыми амплитудами (0,1 Å), а при высоких температурах появляются более крупномасштабные смещения (0,3—0,6 Å). Увеличение внутренней подвижности белка и в этом случае коррелирует с соответствующим ростом его функциональной активности (рис. 9.6). Временное разрешение в методе ЯГР лимитируется временем τ^* возбужденного состояния ядра ^{57}Fe ($\tau^* \sim 10^{-7}$ с). Фактически с по-

Лекция 10. ФИЗИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ДИНАМИЧЕСКОЙ ПОДВИЖНОСТИ БЕЛКОВ

В предыдущей лекции мы познакомились с характерными временами и амплитудами движений участков белка, которые можно найти экспериментально. Обратим внимание еще раз на то, что полученные величины, конечно, зависят от временного разрешения используемого метода и описывают движение в той микрообласти белка, где локализована соответствующая метка. Для того чтобы на основании этих данных представить себе общую картину и понять законы внутренней динамики белка, необходимо на основе экспериментальных данных составить соответствующие физические модели и проанализировать их свойства. Известно, что малые колебания атомов в твердом теле происходят с высокими частотами $\omega_0 \sim 10^{13} \text{ с}^{-1}$ ($\tau \sim 10^{-13} \text{ с}$) и малыми амплитудами $x_a \sim 0,01 - 0,1 \text{ \AA}$. Эти колебания можно описать как обычные гармонические колебания. Однако такой подход неприменим для описания микродвижений белка с амплитудами $x_a \gg 0,1 \text{ \AA}$. Плотность белка очень велика и сравнима с плотностью жидкостей и органических кристаллов. Поэтому смещение отдельного фрагмента белка на величину, большую чем $0,1 \text{ \AA}$, возможно только, если оно одновременно сопровождается образованием флуктуационной полости из-за сдвига других молекулярных групп, окружающих данный фрагмент. Фрагмент белка как бы «расталкивает» соседние группы. Такое движение требует энергии активации для преодоления потенциальных энергетических барьеров, препятствующих смещению фрагмента. Поскольку переход из одного микросостояния в другое сопровождается большими смещениями ($\sim 1 \text{ \AA}$), то и ширина барьера должна быть довольно большой. Такой процесс перехода нельзя уподобить «одноактному» перескоку между двумя микроинформационными состояниями. Переход через широкий барьер здесь представляет собой непрерывный процесс движения в потенциальном поле со сложным рельефом — частой потенциальной гребенкой (рис. 10.1). Таким образом, движение фрагмента белка характеризуется двумя пространственными масштабами. Движение по «частоколу» из частых потенциальных барьеров отражает взаимодействие фрагмента с окружающими белковыми группами. Оно носит диффузионный характер и характеризуется коэффициентом конформационной диффузии $D(x)$, зависящим от окружающей среды или от конформационной координаты x . Другой пространствен-

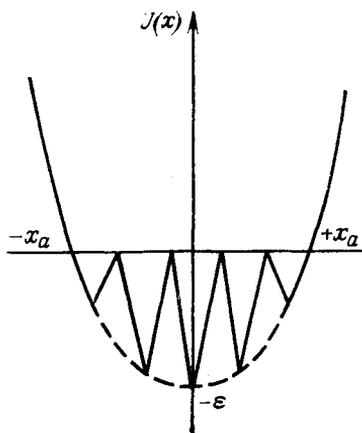


Рисунок. Конформационное движение в вязкой среде (имитация вязкости потенциальной гребенкой). x_a — средняя амплитуда конформационных флуктуаций; $U(x)$ — конформационный потенциал; ε — энергия активации конформационных движений

ный масштаб отражает результирующее медленное перемещение вдоль самой конформационной координаты и происходит в конформационном потенциале $u(x)$. Как видно из рисунка, выход за пределы конформационной энергетической ямы $[-x_a, x_a]$ запрещен, так как связанный с остальной белковой молекулой фрагмент не может отойти как угодно далеко. Такое движение в целом соответствует непрерывной ограниченной диффузии в вязкой среде, когда фрагмент испытывает действие случайных толчков или теплового шума. Временная зависимость среднего квадратичного смещения $[\bar{x}(t)]^2$ в этом процессе определяется формулой

$$[\bar{x}(t)]^2 = \bar{x}_a^2 (1 - e^{-t/\tau_c}). \quad (10.1)$$

Здесь \bar{x}_a^2 — средний квадрат амплитуды смещения, τ_c — характерное время релаксации в процессе ограниченной диффузии, зависящее от трения при движении. Оно равно

$$\tau_c = \gamma / m \omega_0^2, \quad (10.2)$$

где γ — коэффициент трения, пропорциональный микровязкости белка, m — масса фрагмента, ω_0 — частота колебаний. Напомним, что коэффициент трения зависит от микровязкости белка согласно известной формуле Стокса

$$\gamma = 6\pi b \eta, \quad (10.3)$$

где b — характерный линейный размер фрагмента ($b \sim 1-10 \text{ \AA}$), η — вязкость в пузах (пз). Повышение температуры экспоненциально уменьшает вязкость

$$\eta(T) \sim e^{\varepsilon/k_B T} \quad (10.4)$$

(ε — энергия активации, вязкого течения).

Значит, с ростом температуры экспоненциально уменьшается и время τ_c , так как

$$\tau_c = \frac{\gamma}{m \omega_0^2} = \frac{6\pi b \eta}{m \omega_0^2}, \quad (10.5)$$

$$\tau_c \sim \eta \sim e^{\varepsilon/k_B T}.$$

Увеличение вязкости среды приводит к росту τ_c , т. е. к уменьшению скорости диффузии. Отсюда можно понять влияние температуры на внутримолекулярное движение в белке и, в частности, зависимость среднеквадратичного смещения мессбауэровского атома от температуры (см. рис. 9.5). При низких температурах τ_c очень велико, и при поглощении γ -кванта мессбауэровское ядро не успевает сместиться за время пребывания в возбужденном состоянии. В этом случае происходит поглощение γ -кванта без отдачи ($f' \sim 1$). Наоборот, в области высоких температур, где η и τ_c малы, ядро успевает сместиться и f' падает. Таким образом, при повышении температуры в точке излома температурной кривой (см. рис. 9.5) изменяется величина τ_c , которая становится ниже критического значения. По температурной зависимости $f'(T)$ можно найти величины микровязкости η для белков, энергии активации ϵ вязкого течения, амплитуды x_a конформационных движений. Обработка экспериментальных данных для белков дает обычные значения $\eta \sim 10^2$ при 300К, что намного больше вязкости воды и глицерина, $\epsilon \sim 20$ кДж/моль, $x_a \sim 0,4 \text{ \AA}$. Имеющиеся в структуре белка α - и β -элементы испытывают ограниченное диффузионное движение, зависящее от жесткости, микровязкости среды. Изгибные флуктуации α -спиралей имеют определенную форму, причем амплитуда и время релаксации резко зависят от линейных размеров спирали. В реальных условиях амплитуды изгибных флуктуаций могут достигать нескольких ангстрем, а времена релаксации лежат в микросекундном диапазоне.

Таким образом, в белке имеется набор связанных элементов, существенно различающихся по временам релаксации. Наиболее быстрые и мелкомасштабные флуктуации присущи боковым группам. Эти группы образуют жидкоподобную опушку вокруг спиральных участков полипептидного каркаса и играют роль демпфирующей среды. Иерархия во временах релаксаций позволяет представить динамику белковой глобулы как флуктуации в жидкоподобной капле, армированной упругим полипептидным каркасом. Зависимость скорости реакции в белках от вязкости растворителя можно понять на основе этих представлений. Диффузия лигандов внутри глобулы происходит лишь при образовании флуктуационных полостей или «дырок». Появление «дырки» внутри глобулы может быть инициировано образованием ее вначале в растворителе на поверхности глобулы. Вероятность этого процесса обратно пропорциональна вязкости растворителя. За счет конформационных движений поверхностная группа белка заполняет «дырку» в растворителе. Тем самым «дырка» теперь оказывается уже в наружном слое белка. Далее, за счет движений групп второго и более глубоких слоев «дырка» диффундирует внутрь глобулы, обеспечивая появление дополнительных флуктуационных полостей. Форма этих полостей в белке, как мы видели, не произвольна, а имеет вид флуктуирующих щелей, параметры которых определяются

геометрией жестких элементов белкового каркаса. Решение диффузионных уравнений позволяет вычислить скорость диффузии частиц через систему таких флуктуирующих щелей. Так, при диффузии в миоглобине лиганд СО должен пройти несколько «ворот», которые открываются за счет конформационных движений. Скорость диффузии зависит от диаметра лиганда, амплитуды флуктуации и времени релаксации щели, которая в свою очередь определяется жесткостью и микровязкостью стенок. Для миоглобина расчетные и экспериментальные данные совпали. В частности, оказалось, что общее время прохождения СО в миоглобине составляет 10^{-7} с и соответствует сложению времен конформационных релаксаций нескольких ворот в глобуле. Отметим, что в жесткой молекуле белка, где отсутствуют внутримолекулярные движения и структурные флуктуации, диффузия лиганда должна быть сопряжена с преодолением больших активационных барьеров (до 100 ккал/моль). Эти барьеры настолько замедляют движение лиганда, что оно практически станет бесконечно медленным в масштабах биологического времени. Иными словами, в реальных биополимерах, с плотной упаковкой именно структурные флуктуации делают возможным перенос лигандов внутри молекулы, что важно для ее функциональной активности.

Более сложные виды кооперативных релаксационных процессов в белке мы рассмотрим позднее в связи с механизмами ферментативного катализа.

Численное моделирование динамики белка — сравнительно новое направление в молекулярной биофизике, где проблема детального описания движений отдельных атомов и их вклада в конформационные переходы. В предыдущих лекциях было показано, что конформационная энергия белка определяется атом-атомными взаимодействиями и описывается специальными потенциальными функциями. В результате можно получить энергетические карты, на которых видны усредненные координаты атомов, соответствующие условиям минимума общего конформационного потенциала. Подобную картину дает и метод рентгеноструктурного анализа, с помощью которого определяют среднестатистические положения атомов в белковой структуре. Однако такими способами невозможно проследить за движениями и флуктуациями положения отдельных атомов, которые лежат в основе конформационных флуктуаций и переходов в белках. В методе численного моделирования динамики белка для отдельных атомов непосредственно решаются классические уравнения движения, в которых движущие силы определены из известных потенциальных функций атом-атомных взаимодействий. Исходные координаты тяжелых атомов (не водородных) задаются по рентгеноструктурным данным, причем в начальный момент времени скорости их движения считаются равными в различных, случайно выбранных направлениях. Начальные ускорения движения вычисляются как первые производные сил,

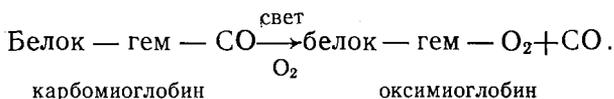
действующих на атомы в исходной структуре. Затем, на электронно-вычислительных машинах производится решение системы уравнений движения для всех атомов. Численное решение этих уравнений представляет собой траектории движения отдельных атомов и дает совокупную картину развития структурных флуктуаций во времени. Пока еще удастся проследить за движениями атомов на коротком отрезке времени от $t=0$ до ~ 200 пс ($1 \text{ пс} = 10^{-12} \text{ с}$), что обусловлено в основном большим объемом вычислений.

В качестве примера приведем результаты моделирования внутренней динамики белка-ингибитора трипсина (ИТ) панкреатической железы, молекула которого содержит 454 тяжелых атома. Оказалось, что реальные флуктуации положений атомов в белке по отношению к усредненной во времени структуре составляют для α -углеродных $0,6 \text{ \AA}$ и $0,75 \text{ \AA}$ для всех остальных атомов. Наблюдаются также флуктуации в значениях двугранных углов ϕ и ψ вращения в пептидной цепи в пределах $10\text{--}20^\circ$ и для угла ω в пределах $7\text{--}9^\circ$. Эти флуктуации положений быстро затухают в течение $1\text{--}2$ пс. Однако имеются и долгоживущие, до 20 пс, флуктуации в положении α -углеродных атомов, которые, по-видимому, отражают конформационные переходы в белке. Регулярность флуктуационных движений нарушается тем значительнее, чем чаще атомная группа испытывает столкновения с другими атомами своего микроокружения. В пределах общего широкого конформационного минимума в белке совершаются спонтанные переходы из одного микросостояния в другое за счет тепловой энергии, например вращение ароматического кольца тирозина в молекуле ИТ. Моделирование на ЭВМ этого процесса показало, что сам переход через потенциальный барьер происходит самопроизвольно, а не за счет сильных активационных соударений с атомами микроокружения кольца. Кольцо тирозина пересекает барьер за время ~ 1 пс по определенной траектории, а толчки микроокружения только стремятся «отвести» кольцо от барьера и «сбить» его с естественной траектории спонтанного перехода. Флуктуации положений отдельных атомов в белке коррелируют друг с другом, что может привести к большим по масштабу структурным сдвигам и конформационным перестройкам. Флуктуационные «дрожания» атомов создают условия и предпосылки для функционально направленных конформационных переходов в белках. Мы еще пока далеки от построения детальной картины динамики белка. Однако уже сейчас можно сделать некоторые общие выводы, основанные на сопоставлении теоретических и экспериментальных результатов по внутримолекулярной подвижности и ее роли в функциональной активности белка. Атомные группы в белке испытывают на себе действие различных сил (кулоновские, ван-дер-ваальсовы взаимодействия), а также случайных «тепловых» толчков со стороны соседних групп. Кроме того, они могут участвовать и в нормальных колебаниях,

когда небольшие смещения атомов от положения равновесия носят гармонический характер. Наблюдаются также сравнительно редкие «прыжки» с преодолением активационных барьеров. Вообще говоря, каждая атомная группа может участвовать в различных движениях, так что общее смещение атома зависит сложным образом от вкладов различных сил. В большинстве белков амплитуда флуктуаций растет при удалении от центра к периферии молекулы. Для атомов основной цепи средне-квадратичные смещения составляют 20,4 Å, а для атомов на длинных боковых цепях — около 1,5 Å. Элементы вторичной структуры (α и β), имеющие водородные связи, характеризуются меньшими флуктуациями, чем другие, «неорганизованные», части белка. Широкие вариации амплитуд флуктуаций указывают на гетерогенность белка и наличие участков, различающихся по подвижности и гибкости. В отличие от остатков, находящихся внутри молекулы белка, движение боковых цепей, особенно содержащих заряженные группы, подвержено сильному влиянию окружающей среды (растворителя). Само по себе движение атомов носит анизотропный характер, когда случайные флуктуации сильно отличаются по амплитудам в зависимости от направления смещения (иногда в 2 раза). Направление наибольшего смещения атома определяется особенностями крупномасштабных коллективных взаимодействий этого атома и соседних групп. Такие кооперативные движения происходят за долгое время ≥ 10 пс по сравнению с локальными смещениями ($\sim 0,2$ пс). Корреляция мелких флуктуационных смещений приводит к появлению кооперативных крупномасштабных движений, включающих большое число атомов. Мелкие смещения играют еще роль «смазки», облегчающей крупномасштабные смещения, когда происходит вовлечение белковых доменов уже за более длинные («физиологические») времена. Именно коллективные движения важны в процессе функционирования белка, при котором происходят направленные смещения его структурных элементов, необходимые для достижения активной конформации.

Лекция 11. МИГРАЦИЯ ЭНЕРГИИ И ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНА В БИОСТРУКТУРАХ

До сих пор мы рассматривали внутримолекулярную подвижность белков, которая носит самопроизвольный характер и обусловлена тепловым движением. Однако участие белков в метаболических процессах и механизмы функциональной активности всегда связаны с изменением их электронного состояния. Именно этот фактор индуцирует в белке определенные конформационные переходы, направленные к достижению нового равновесия с минимумом конформационной энергии, которое соответствует измененному электронному состоянию макромолекулы. Сами электронные переходы и изменение электронного состояния биополимеров происходят намного быстрее, чем вызванные ими конформационные перестройки. Поэтому в первом приближении электронные и конформационные переходы можно рассматривать отдельно. Электронные переходы в биополимерах имеют самостоятельное значение в целом ряде важнейших биологических процессов. Особую роль играют миграция энергии электронного возбуждения и транспорт электронов в биологических структурах. Впервые миграция энергии электронного возбуждения в белке была обнаружена в опытах по фотодиссоциации карбомиоглобина, представляющего собой комплекс СО-миоглобин. Под действием света в присутствии кислорода происходило отщепление СО от карбомиоглобина с образованием оксимиоглобина:



Оказалось, что эффективность этого процесса одинакова в случае, когда свет поглощался гемом ($\lambda \sim 410$ нм) или белком ($\lambda \sim 280$ нм). Это говорит о миграции энергии возбуждения от белка на гем. Впоследствии были обнаружены многочисленные случаи переноса энергии между ароматическими аминокислотами в белках нуклеотидными основаниями, а также от белка на присоединенные к нему хромофорные люминесцирующие молекулы красителей. Примером миграции энергии, имеющей важнейшее биологическое значение, может служить перенос возбуждения от светособирающих молекул пигментов (хлорофилла) к реакционному центру в фотосинтетических мембранах.

Перенос электрона в биоструктурах происходит на большие расстояния без непосредственного контакта донора и акцептора электрона. В митохондриях и хлоропластах именно электронный транспорт лежит в основе важнейших энергетических процессов — дыхания и фотосинтеза. В этих органеллах расстояния между различными простетическими группами переносчиков, непосредственно передающих электрон, составляют около 10—15 Å. Одна из интересных особенностей состоит в том, что на отдельных этапах электронного транспорта в биоструктурах перенос электрона может с большой эффективностью происходить при низких температурах, включая температуры жидкого азота и жидкого гелия. Такие низкотемпературные стадии переноса электрона обнаружены в фотосинтетических реакционных центрах. Рассмотрим механизмы электронных переходов в биополимерах.

Миграция энергии. Поглощение кванта света в сложной молекуле, содержащей π -электроны, вызывает переходы между уровнями (S_0 , S_1 , T), как было показано на рис. 8.1. В любых фотобиологических процессах роль электронного возбуждения состоит в том, что таким путем преодолевается активационный барьер начальной стадии реакции. Однако в фотосинтезе свободная энергия конечных продуктов выше, чем начальных (CO_2 и H_2O), и поэтому здесь происходит еще и запасание энергии света в виде энергии химических связей продуктов фотосинтеза. Физическая причина переноса электронной энергии от возбужденной молекулы донора D^* к молекуле акцептора A



определяется природой их взаимодействия. Перенос происходит за счет кулоновского взаимодействия между электронами в молекулах D и A . Во время существования возбужденного состояния молекулы D^* генерируется переменное электромагнитное поле за счет осцилляции заряда электрона. Это поле взаимодействует с электроном в невозбужденной молекуле акцептора A . Если частота переменного поля D^* совпадает с частотой перехода электрона в A на возбужденный уровень, то происходит перенос энергии. При этом молекула D^* возвращается в основное, а молекула A переходит в возбужденное состояние. Никакого высвечивания кванта света молекулой D^* и перепоглощения его молекулой A не происходит, а перенос носит безызлучательный характер. Этот механизм миграции носит название индуктивно-резонансного и осуществляется при слабых энергиях взаимодействия между молекулами ($E_{\text{вз}} \sim 10^{-3}$ эВ). Время $\tau_{\text{м}}$ миграции энергии в этом случае много больше, чем 10^{-12} с:

$$\tau_{\text{м}} \gg 10^{-12} \text{ с,}$$

т. е. превышает время тепловой деградации энергии по колебательным подуровням. Это значит, что в процессе миграции энер-

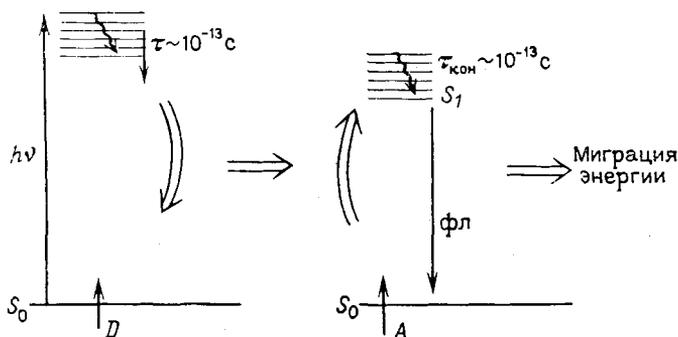


Рис. 11.1. Схема миграции энергии электронного возбуждения

гии при возбуждении очередной молекулы она успевает перейти на нижний колебательный подуровень возбужденного состояния, откуда уже возможен дальнейший перенос возбуждения или испускание света флуоресценции (рис. 11.1). Классический аналог индуктивно-резонансного механизма миграции — два связанных веревкой маятника (рис. 11.2). Энергия колебаний одного из них передается механическим путем другому, который начинает колебаться, а колебания первого затухают. Вероятность индуктивно-резонансного перехода пропорциональна степени перекрытия спектра флуоресценции донора и спектра поглощения акцептора (рис. 11.3) и обратно пропорциональна R^6 , где R — расстояние между взаимодействующими молекулами. Расстояния, на которых эффективно происходит индуктивно-резонансный перенос энергии, составляют около 20—50 Å со скоростями 10^6 — 10^{11} с⁻¹. При понижении температуры спектральные полосы флуоресценции Д и поглощения А сужаются, степень их перекрытия уменьшается и вероятность переноса падает.

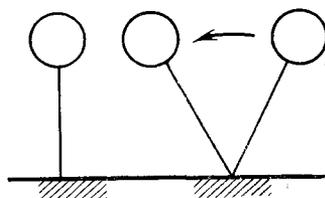


Рис. 11.2. Механический аналог индуктивно-резонансного механизма

Индуктивно-резонансный перенос возможен не только между синглетными уровнями донора и акцептора, но и по триплет-синглетному ($D_T \rightarrow A_{S_1}$) и синглет-триплетному механизму ($D_S \rightarrow A_T$). На более коротких расстояниях 1—3 Å порядка длины химической связи электронные орбитали донора и акцептора

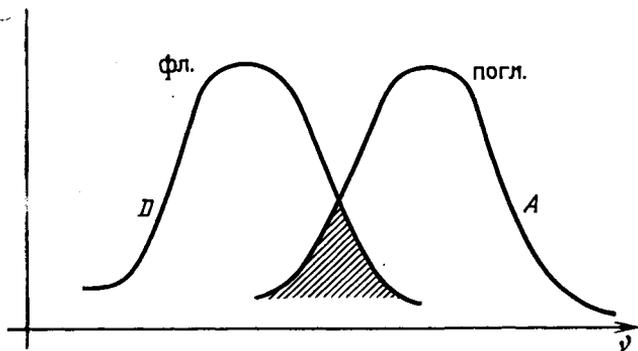
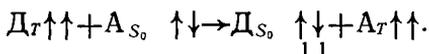
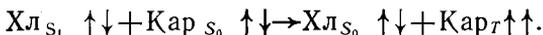


Рис. 11.3. Перекрытие спектров флуоресценции донора (D) и поглощения акцептора (A)

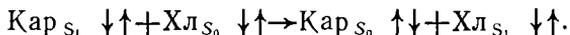
могут перекрываться. Тогда перенос возбуждения осуществляется по так называемому обменно-резонансному механизму, при котором происходит «обмен» электронами и электронными состояниями. Например, триплет-триплетный перенос можно представить в виде схемы



В фотосинтетических мембранах обменно-резонансная передача происходит от хлорофилла в состоянии S_1 на более низкий триплетный уровень каротиноидов



Как видно, здесь не сохраняется суммарный спин в системе D и A. В то же время молекулы каротиноидов, поглотившие свет и перешедшие в состояние S_1 , могут отдавать энергию хлорофиллу, так как их S_1 уровень расположен выше S_1 уровня хлорофилла



Другой, так называемый экситонный механизм миграции энергии, возбуждения осуществляется при больших энергиях взаимодействия ($\sim 10^{-2}$ эВ). В этом случае время миграции $\tau_m \ll 10^{-12}$ с и составляет $10^{-13} - 10^{-14}$ с. Возбуждение, попавшее в молекулу донора, может перейти в соседнюю молекулу акцептора раньше, чем успеет произойти релаксация на нижние колебательные уровни состояния S_1 молекулы донора. Возбуждение как бы бежит по верхним колебательным уровням взаимодействующих молекул, не успевая локализоваться на каждой из них в отдельности (рис. 11.4). В этой ситуации возбуждением одновременно охвачено несколько сот молекул, и оно носит коллективный характер. Такой тип миграции называется экс-

тонным, а сама область возбуждения, включающая большое число молекул,— экситоном. В фотосинтетических мембранах экситонный механизм имеет место при миграции энергии в пределах группы однородных молекул пигмента, фиксированных на одном и том же белковом носителе. Перенос между разными пигмент-белковыми комплексами идет по индуктивно-резонансному механизму.

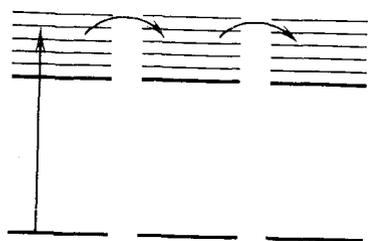


Рис. 11.4. Схема экситонного переноса энергии: возбуждение «бежит» по верхним колебательным уровням взаимодействующих молекул

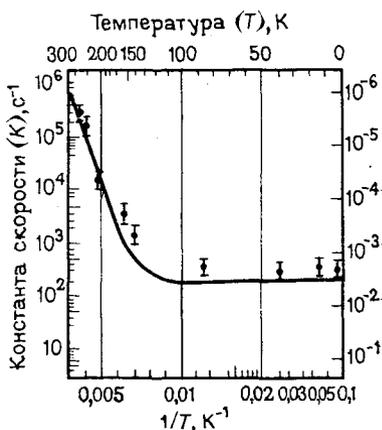


Рис. 11.5. Температурная зависимость скорости окисления цитохрома в фотосинтезирующих бактериях

Туннельный механизм обеспечивает эффективный транспорт электронов между донорно-акцепторными группами, расположенными на расстоянии 10—15 Å. Именно такой перенос может идти в дыхательной и фотосинтетической цепи, где простетические группы погружены в белковые глобулы на 5—10 Å и взаимодействуют друг с другом через белковую матрицу (в цитохромах). Перенос электрона происходит в белке по «электронной тропе». Рассмотрим природу этих процессов. Эксперименты показали, что перенос электрона в фотосинтетической цепи идет эффективно как при комнатных, так и при низких температурах. На рис. 11.5 приведена кривая зависимости окисления цитохрома фотоактивной молекулой бактериохлорофилла в фотосинтетических реакционных центрах. Как видно, кривая носит двухфазный характер. Начальный активационный участок кривой отражает влияние температуры на перестройку ядер атомов в белковых частях переносчиков, которые необходимы для обеспечения эффективного переноса электрона. При низких температурах эти перестройки затруднены, в результате чего скорость переноса электрона падает. Однако здесь перенос про-

исходит хотя и медленнее, но зато и мало зависит от температуры. Именно этому соответствует безактивационный низкотемпературный участок кривой переноса электрона (рис. 11.5). В основе описанного переноса электрона, сопряженного с перестройкой ядерной системы, лежат так называемые туннельные эффекты, которые связаны с электронно-конформационными взаимодействиями в макромолекулах. Физическая природа туннельного эффекта носит чисто квантовомеханический характер и не имеет классических аналогов. Учитывая важность электронно-конформационных взаимодействий, составляющих основу функционирования макромолекул, мы остановимся подробнее на этих вопросах.

Согласно квантовым представлениям частица (электрон, отдельные ядра) обладает определенной вероятностью прохождения сквозь потенциальный барьер, энергия которого больше, чем энергия самой частицы (рис. 11.6). Такое «просачивание»

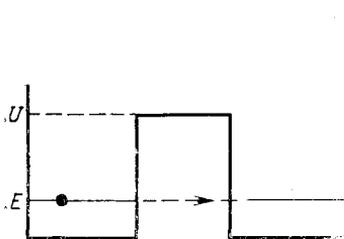


Рис. 11.6. Туннелирование электрона через конечный потенциальный барьер

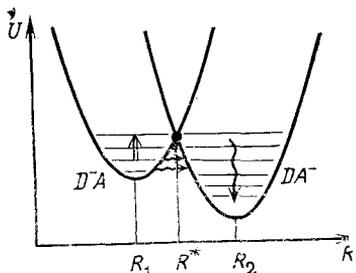


Рис. 11.7. Электронно-колебательные взаимодействия при туннелировании электрона: $R_1 \rightarrow R_2$ — смещение положения равновесия ядер при переходе из электронного состояния $D-A$ в состояние DA^-

сквозь барьер, или туннелирование, не требует тепловой активации. В квантовой механике оно связано с тем, что состояние частицы характеризуется некоторой «размазанностью». Следовательно, существует вероятность найти частицу в разных точках окружающего ее пространства, включая и область, находящуюся за потенциальным барьером. Туннельные переходы совершают электроны и ядра в комплексе ДА. В исходном состоянии (Д-А) ядерные конфигурации донорно-акцепторного комплекса соответствуют состоянию, когда электрон локализован на доноре (Д-А). Ядерная конфигурация конечного состояния после переноса электрона и изменения электронного состояния (Д-А \rightarrow ДА⁻) отличается от начальной и система имеет другую энергию (рис. 11.7). Это значит, что равновесные ядерные координаты R_1 и R_2 начального (Д-А) и конечного (ДА⁻)

состояний отличаются. Однако существует точка R^* , в которой кривые потенциальной энергии пересекаются. Очевидно, в точке R^* энергии начального (Д-А) и конечного (ДА-) состояний совпадают. Допустим, что донорно-акцепторный комплекс, находившийся в состоянии Д-А, перестроился таким образом, что его ядерная координата попала в окрестность точки R^* . Само по себе это необязательно приведет к переносу электрона. Но в точках, близких к R^* , сравнительно невелика ширина барьера туннелирования, отделяющего потенциальные кривые начального и конечного состояний. Поскольку около точки R^* энергии начального и конечного состояний близки, то во время пребывания системы около R^* электрон может успеть протуннелировать от Д- на А. Для закрепления на акцепторе электрон должен успеть потерять часть своей энергии, чтобы не вернуться таким же образом назад. В свою очередь для этого ядерная система должна успеть перестроиться так, чтобы часть электронной энергии ушла в тепло, а вся система приобрела бы ядерную конфигурацию, соответствующую состоянию ДА- с координатой R_2 . В этом случае за время пребывания электрона на А ядерная конфигурация изменится так, что система «свалится» в точку R_2 . В результате произойдет необратимый перенос электрона от Д к А и система перейдет в состояние ДА-.

Ядерная система комплекса ДА, находящегося в исходном состоянии R_1 , может попасть в окрестность точки R^* за счет тепловой активации и перехода на верхние колебательные уровни исходного состояния, где координаты ядер близки к R^* . Этому процессу соответствует активационный температурно-зависимый участок двухфазной кривой переноса электрона. При низких температурах ядра находятся на нижних колебательных уровнях, где ширина барьера между потенциальными кривыми начального и конечного состояний шире, чем на верхних уровнях. В этом случае существует меньшая вероятность туннелирования ядер в конечное состояние, которая уже не зависит от температуры.

Таким образом, общая вероятность W туннельного переноса электрона, сопряженного с перестройкой ядерной системы и тепловой диссипацией части электронной энергии, складывается из двух частей:

$$W = W_0 + W_1 e^{-\hbar\omega/k_B T} \quad (11.1)$$

Здесь W_0 — вероятность подбарьерного, не зависящего от температуры туннелирования с нижних колебательных уровней; W_1 — вероятность надбарьерного активационного процесса; $W_0 \ll W_1$, $\hbar\omega$ — энергия колебательного кванта, необходимая для активации переноса.

Электронно-конформационные взаимодействия. Как видно, туннелирование собственно электрона неотделимо от сопряженных процессов перестройки ядерной системы. Однако последние неоднородны по своим масштабам.

Мы описали процесс начальных электронно-колебательных взаимодействий (рис. 11.7), которые обеспечивают туннелирование электрона и закрепление его на молекуле акцептора за счет потери части электронной энергии ($< 0,1$ эВ). Появление электрона на акцепторе вслед за этим индуцирует более глубокие конформационные перестройки в комплексе, что, собственно, и составляет природу электронно-конформационных взаимодействий. Начальная колебательная релаксация происходит за время $10^{-12} - 10^{-13}$ с и связана со смещениями ядер на доли ангстрема ($< 0,1$ Å). Конформационные перестройки длятся, как правило, намного дольше (до $10^{-3} - 10^6$ с) и могут быть сопряжены со смещениями ядер порядка нескольких ангстрем. Эти перестройки носят уже функциональный характер. В частности, в фотосинтетической системе переноса электрона они включают образование таких контактных состояний между переносчиками, которые обеспечивают направленное туннелирование между ними в транспортной цепи. Сопряжение функциональной активности переносчика электрона с его внутримолекулярной подвижностью качественно имеет следующий характер. Простетическая акцепторная группа I переносчика в отсутствие электрона совершает стохастические движения по механизму ограниченной диффузии (см. рис. 9.1) вдоль конформационной координаты R (кривая 1 на рис. 11.8). При движении она попадает в точку R_1 , где принимает электрон от внешнего донора. Этот акт происходит по механизму туннелирования с

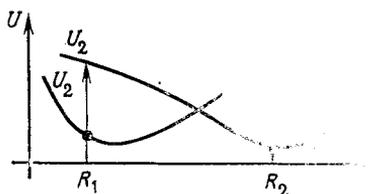


Рис. 11.8. Модель «молекулярного насоса», или электронно-конформационное взаимодействие в процессе электронного транспорта. Стрелки — «ограниченная диффузия» вдоль конформационной координаты R

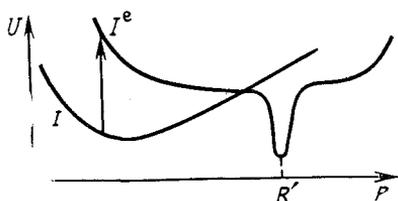


Рис. 11.9. Организация цепи электронного транспорта $D \rightarrow I_1 \rightarrow I_2 \rightarrow A$ при наличии «защелок» в активном состоянии R' для реакции $I \rightarrow I^e$ напряженная конформация — резкий минимум на кривой конформационного потенциала

закреплением электрона и потерей части энергии ($\leq 0,1$ эВ) по колебательным степеням свободы внутри донорно-акцепторного комплекса. Восстановление группы I изменяет ее зарядовое состояние и характер взаимодействия с окружением внутри белка. В результате она переходит с кривой 1 ($v_1(R)$) на другую

кривую 2 ($u_2(R)$) конформационной энергии. Теперь, двигаясь стохастически вдоль конформационной координаты R , группа I попадает в точку R_2 , здесь она отдает электрон внешнему акцептору и возвращается вновь на кривую 1 ($v_1(R)$). Надо ясно понимать, что само по себе стохастическое движение вдоль конформационной координаты идет с диссипацией энергии и не может быть сопряжено с ее запасанием. На своем пути молекулярная группа может взаимодействовать с окружением, например с заряженными «фиксаторами», и задерживаться на долгое время в определенных положениях. Тем самым создается напряженная конформация, в которой и происходит запасание энергии. Этот случай соответствует появлению резкого минимума на кривой конформационного потенциала, на которую перешла акцепторная группа после принятия электрона (рис. 11.9). В точке R' может находиться положительный заряд, фиксирующий положение группы I^e в напряженной конформации.

Лекция 12. МЕХАНИЗМЫ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

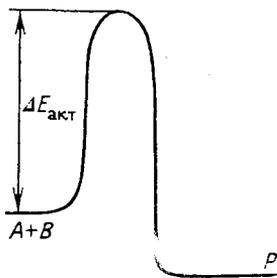
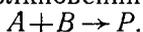


Рис. 12.1. Изменение энергии реагентов вдоль координаты реакции

Ферменты играют ключевую роль в метаболизме. Они ускоряют реакции, увеличивая их константы скоростей. Рассмотрим энергетический профиль обычной реакции (рис. 12.1), проходящей в растворе по механизму столкновений



Образование продукта P происходит, если энергия сталкивающихся молекул исходных веществ A и B превышает величину энергетического барьера. Очевидно, можно ускорить эту реакцию, если каким-то образом уменьшить величину энергии активации.

Общая схема ферментативной реакции, включает, как мы знаем, образование единого фермент-субстратного комплекса, в активном центре которого и происходит разрыв старых и образование новых связей с появлением продукта. В различных теоретических моделях механизма действия ферментов предлагаются разные способы понижения барьера реакции в фермент-субстратном комплексе. В результате фиксации субстрата на ферменте происходит некоторое снижение энтропии реагентов по сравнению с их свободным состоянием. Само по себе это облегчает дальнейшие химические взаимодействия между активными группами в фермент-субстратном комплексе, которые должны быть взаимно строго ориентированы. Предполагается также, что избыток энергии сорбции, который выделяется при связывании субстрата, не переходит полностью в тепло. Энергия сорбции может быть частично запасена в белковой части фермента, затем сконцентрироваться на атакуемой связи в области образовавшихся фермент-субстратных контактов. Таким образом, постулируется, что энергия сорбции идет на создание низкоэнтропийной энергетически напряженной конформации в фермент-субстратном комплексе и тем самым способствует ускорению реакции. Однако экспериментальные попытки обнаружить упругие деформации, которые могли бы храниться в белковой глобуле фермента, не диссипируя в тепло в течение достаточно длительного времени между каталитическими актами

(10^{-2} — 10^{-3} с), не увенчались успехом. Более того, нужная для катализа взаимная ориентация и сближение расщепляемой связи субстрата и активных групп в центре фермента происходят спонтанно, вследствие внутримолекулярной подвижности разных, в том числе и активных, групп фермента и субстрата. Такое сближение не требует образования каких-либо энергетически неблагоприятных контактов. Этот вывод следует из анализа невалентных взаимодействий в активных центрах ряда ферментов (α -химотрипсин, лизоцим, рибонуклеаза, карбокси-пептидаза). Таким образом, сама по себе напряженность конформации в фермент-субстратном комплексе не является необходимым источником энергии и движущей силой катализа.

В других моделях высказывается предположение о том, что в белковой глобуле происходит бездиссипативная передача энергии тепловых колебаний от наружных слоев белка к атакуемой связи в активном центре. Однако никаких серьезных доказательств этому нет, кроме утверждения, что фермент должен быть «устроен» так, что его структура обеспечивает когерентный характер распространения флуктуационных изменений конформации без тепловых потерь по определенным степеням свободы. Помимо отсутствия экспериментальных доказательств общим недостатком этих моделей является то, что в них не учитывается в явном виде важный фактор — спонтанная внутримолекулярная подвижность белка. Шаг вперед в этом отношении сделан в конформационно-релаксационной концепции ферментативного катализа. В ней появление продукта рассматривается как результат последовательных конформационных изменений в фермент-субстратном комплексе, индуцированных первоначальными изменениями электронного состояния в активном центре фермента. Вначале, в течение короткого времени (10^{-12} — 10^{-13} с), происходят электронно-колебательные взаимодействия, затрагивающие только выделенные химические связи субстрата и функциональные группы фермента, но не остальную часть белковой глобулы. Вследствие этого создается конформационно-неравновесное состояние, которое релаксирует к новому равновесию с образованием продукта. Процесс релаксации происходит медленно и носит направленный характер, включая стадии отщепления продукта и релаксации свободной молекулы фермента к исходному равновесному состоянию. Координата ферментативной реакции совпадает с координатой конформационной релаксации. Температура же влияет на конформационную подвижность, а не на число активных соударений свободных молекул реагентов, что просто не имеет места в уже сформированном фермент-субстратном комплексе.

Вследствие больших различий в скоростях мы можем рассматривать отдельно быстрые электронные взаимодействия в активном центре, осуществляющиеся на коротких расстояниях, и более медленные конформационно-динамические изменения в белковой части. На первом этапе катализа стохастический ха-

рактир динамики белковой глобулы фермента и диффузии субстрата к активному центру приводят к образованию строго определенной конфигурации, включающей функциональные группы фермента и химические связи субстрата. Например, в случае гидролиза пептидной связи для реакции необходима одновременная атака субстрата двумя группами активного центра — нуклеофильной и электрофильной. На рис. 12.2 приведено

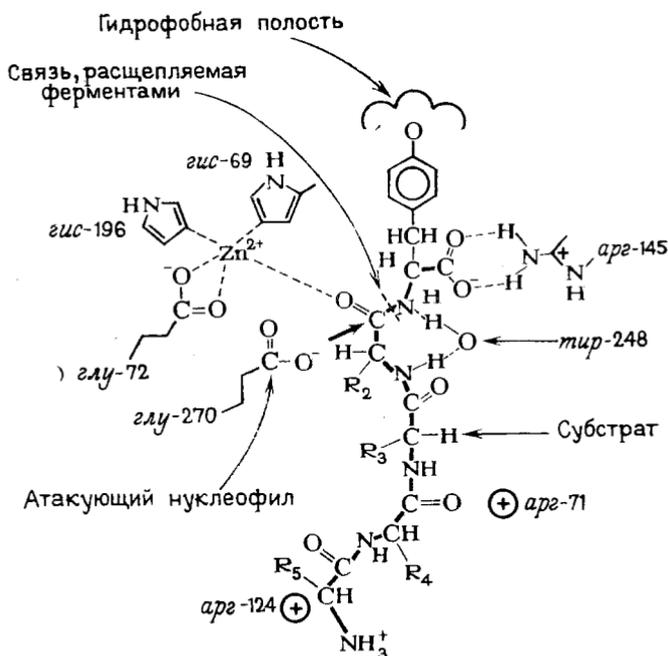


Рис. 12.2. Пример образования активной конфигурации или цепи перераспределения связей в случае гидролиза пептидной связи карбоксилазой А

взаимное расположение расщепляемой пептидной связи субстрата и боковых цепей Сер.—195, Гис—57. Атом O_{155} остатка Сер.—195 находится на расстоянии 2,8 Å против карбонильного углерода C^I , а протон гидроксильной группы, не нарушая водородной связи с атомом N Гис—57, располагается на расстоянии 2,0 Å над атомом азота расщепляемой группы. При возникновении такой и только такой конфигурации происходит химический акт катализа. Формально это соответствует одновременному соударению нескольких молекул, что в растворе крайне мало вероятно.

Возникает вопрос: какова вероятность спонтанного форми-

рования такого рода реакционноспособной конфигурации в плотно структурированной среде за счет конформационных флуктуаций нескольких групп, происходящих по законам ограниченной диффузии?

Расчеты показывают, что существует вполне определенная вероятность одновременного попадания нескольких групп в «реакционную» область определенного радиуса, где они оказываются сближенными на короткие расстояния. Эта вероятность зависит главным образом от коэффициента диффузии и числа степеней свободы функциональных групп, «ищущих» друг друга в ограниченном пространстве. Например, при гидролизе пептидной связи необходимо создать благоприятную ориентацию для двух групп активного центра относительно определенных участков субстрата. Каждая из групп обладает тремя степенями свободы, а с учетом вибраций молекулы субстрата общее число степеней свободы $N \sim 6-7$. Это в общем типично для ферментативных процессов. Оказывается, что в обычных условиях среднее время образования такой активной конфигурации составляет $\tau \sim 10^{-2}-10^{-4} \text{ с}^{-1}$, что совпадает с временами оборота фермента в условиях субстратного насыщения. В растворе для аналогичной реакции это время намного больше даже при больших коэффициентах диффузии. Причина состоит в том, что, попав в ограниченную область в плотноструктурированной среде, функциональные группы «находят» друг друга и сближаются на короткие расстояния раньше, чем они «разбегутся» в разные стороны, как это происходит в растворе. Вместе с тем величина $\tau \sim 10^{-2}-10^{-4} \text{ с}$ намного больше, чем времена релаксаций отдельных групп, что является следствием достаточно жестких стерических условий для протекания реакции. Увеличение числа функциональных групп и необходимых одновременных контактов между ними увеличивает время достижения многоцентровой активной конфигурации. Общая скорость ферментативного катализа определяется именно временем образования нужной конформации при спонтанном сближении соответствующих групп в активном центре. Последующие за этим электронные взаимодействия происходят гораздо скорее и не лимитируют общую скорость катализа.

Существует ряд особенностей ферментов, облегчающих превращение субстрата в активном центре. Как правило, микросреда активного центра с его аминокислотными остатками более гидрофобна, чем окружающая водная среда. Это снижает значение диэлектрической постоянной активного центра ($\epsilon < 10$) по сравнению с водой ($\epsilon \sim 80$) и усиливает электростатические взаимодействия в гидрофобной среде между субстратом и полярными группами фермента. Кроме того, малополярная по сравнению с водой белковая среда частично экранирует переносимые заряды от действия полярного растворителя. Высокая же локальная концентрация диполей пептидных связей создает в активном центре электрические поля напряженностью

порядка тысяч и сотен тысяч В/см. Таким образом, ориентированные полярные группы создают внутриглобулярное электрическое поле, влияющее на кулоновские взаимодействия в активном центре.

Механизмы самих электронных переходов в активной конфигурации требуют для своей расшифровки привлечения методов квантовой химии. Перекрытие электронных орбиталей может привести к перераспределению электронной плотности, появлению дополнительного заряда на разрыхляющей орбитали атакуемой связи в субстрате и ее ослаблению. Именно это и происходит при гидролизе пептидной связи в тетраэдрическом комплексе (рис. 12.3). Стеkanie электронной плотности от O^{γ}_{195} —Сер—195 на разрыхляющую орбиталь в пептидной связи происходит за счет взаимодействия неподеленной пары электронов O^{γ}_{195} с π -электронами атома C^1 пептидной связи. При этом неподеленная пара азота аминной группы выталкивается из пептидной связи $N=C^1$, которая утрачивает двойной характер и в результате ослабляется. Одновременно стекание электронной плотности от O^{γ}_{195} ослабляет и связь $H-O^{\gamma}_{195}$. Но тогда облегчается взаимодействие H фермента и N аминной группы и

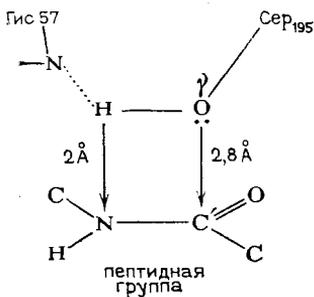


Рис. 12.3. Строение активного центра α -химотрипсина. Цифрами указаны межатомные расстояния (в А)

ее протонирование с переходом протона от O^{γ}_{195} к Гис—57. В свою очередь это опять увеличивает взаимодействие O^{γ}_{195} с пептидной группой и т. д. Таким образом, в тетраэдрическом комплексе создается уникальная ситуация, когда несколько мономолекулярных реакций протекают одновременно, взаимно ускоряя друг друга. Синхронное перемещение заряда и протона между Сер—195, Гис—57, пептидной связью обеспечивает высокую эффективность процесса. Каталитический акт сводит в единую кооперативную систему три отдельные бимолекулярные реакции, ведущие к разрыву пептидной связи — событию, маловероятному в растворе. В системе индицируются естественные конформационные перестройки и в итоге происходит децилирование фермента и протонирование атома O^{γ}_{195} . Принцип образования полифункциональной замкнутой системы атомных групп в активной конфигурации выполняется и в других фермент-субстратных комплексах.

В ферментативном катализе многостадийный характер превращения субстрата, маловероятный в растворе, обеспечивается за счет синхронного кооперативного их протекания в единой полифункциональной системе. Замена малоэффективных последовательных активационных стадий скоординированным про-

цессом приводит формально к снижению энергии активации всей реакции. Заметим еще раз, что, строго говоря, физический смысл понятия «энергия активации» в ферментативных процессах не соответствует таковому для реакций в растворах, идущих по механизму активных столкновений свободных молекул.

Лекция 13. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН. ИОННЫЕ РАВНОВЕСИЯ

Биологические мембраны построены в основном из белков, липидов и углеводов. В состав молекулы природных липидов входят полярная заряженная фосфатная головка и длинные углеводородные цепочки, принадлежащие жирным кислотам. В природных фосфолипидах жирные кислоты могут иметь ненасыщенные двойные связи в основном во втором положении глицеринового остатка. Белки могут пронизывать мембрану насквозь, а могут быть частично или целиком погружены в липидный слой. Взаимодействие с гидрофобными липидами осуществляется в основном неполярными аминокислотными остатками. Белки плавают в липидном слое мембраны в виде отдельных глобулярных частиц и обладают определенной подвижностью. Активность мембранных белков зависит от фазового состояния липидов и вязкости мембраны. На рис. 13.1 дана общая схема строения мембраны, состоящей из двойного липидного слоя с погруженными в него молекулами белка. Толщина биологических мембран обычно не превышает 100 Å.

Изучение физико-химических свойств мембран удобно проводить на моделях монослоев, которые получают при нанесении липидов на поверхность воды. Повышение давления и уплотнение монослоя приводят к тому, что подвижность углеводородных цепочек уменьшается, их взаимодействие друг с другом растет, а полярные головки фиксируются на поверхности раздела фаз. В пределе происходит такое уплотнение монослоя, где площадь поперечного сечения молекулы липида не зависит от длины углеводородной цепи. Монослой представляет собой лишь половину липидного бислоя мембраны, и более удобной моделью служат различные искусственные бислоенные липидные мембраны (БЛМ). Плоские ламеллярные структуры могут сливаться, образуя замкнутые везикулярные частицы (липосомы), в которых липидные бислои отделяют внутреннюю водную фазу от наружного раствора. В везикулярные частицы можно встраивать белковые молекулы и другие компоненты биологических мембран для изучения механизмов их функционирования в биомембранах. Плоские БЛМ используются для изучения барьерных функций, электромеханических характеристик, а также межмолекулярных взаимодействий в мембранах. Электростатические взаимодействия осуществляются между заряженными группами либо в пределах одного полуслоя (лате-

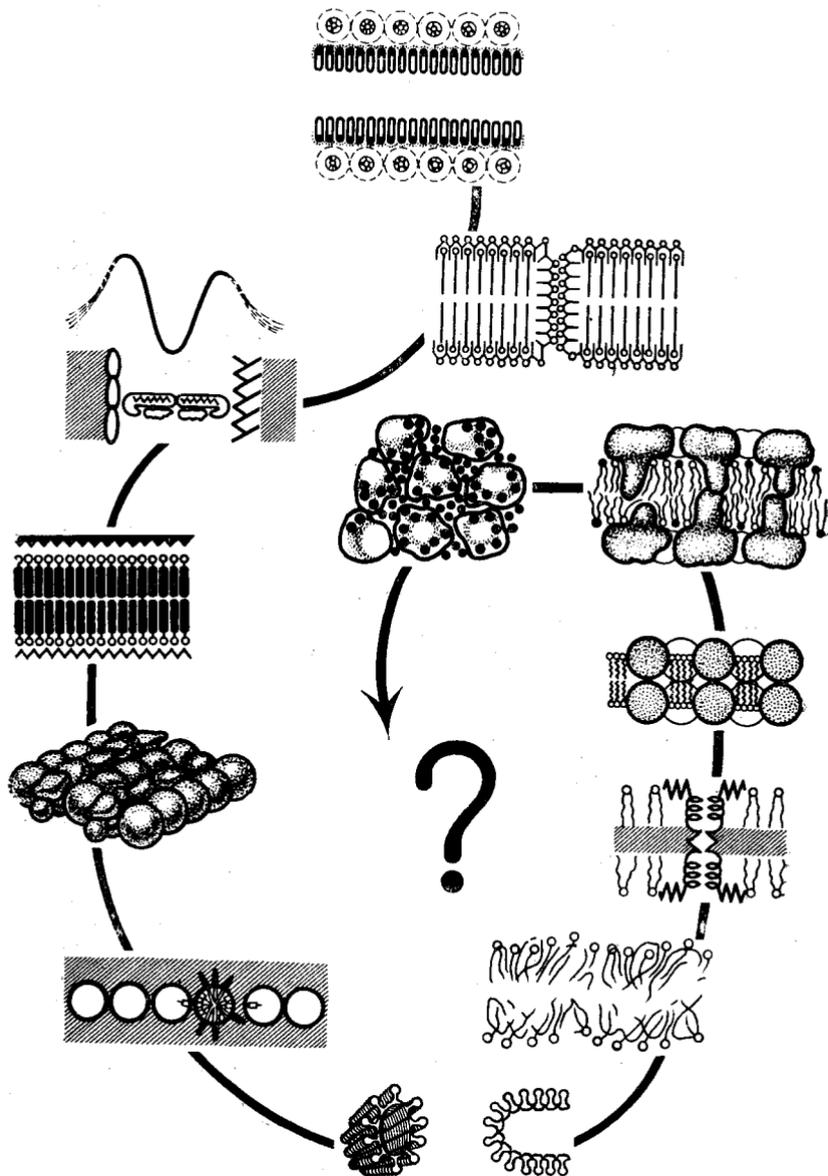


Рис. 13.1. Развитие представления о молекулярной организации биологических мембран

ральные), либо между разными слоями (трансмембранные). Дисперсионные ван-дер-ваальсовы взаимодействия между поверхностями мембран обнаруживаются на расстояниях до 1000 Å. Это значительно превышает расстояния, где проявляется электростатическое отталкивание. Суммарный эффект этих сил может привести к появлению минимума энергии взаимодействия на расстояниях 30—80 Å и слиянию поверхностей клеточных мембран. Этот эффект лежит в основе объединения отдельных клеток в клеточные агрегаты. Компоненты клеточных мембран характеризуются определенной подвижностью. Характерное время $\tau_{\text{вращ}}$ вращательного движения молекул фосфолипидов, жирных кислот в природных мембранах составляет $\tau_{\text{вращ}} \sim 10^{-9}$ с и увеличивается до 10^{-8} с при температуре ниже точки плавления жирнокислотных цепей липидов. Латеральная диффузия липидов вдоль слоя характеризуется довольно большим коэффициентом диффузии $D \sim 10^{-7} - 10^{-8}$ см²/с, величина которого сильно зависит от состава мембран и температуры ($\epsilon_{\text{акт}}$ диффузии ~ 10 ккал/моль). Трансмембранные переходы липидов из одного слоя в другой (флип-флоп переходы) происходят намного медленнее ($\tau_{\text{трансмембр}} \sim 1000$ с). Подвижность молекул белков в мембранах намного меньше ($\tau_{\text{вращ}} \sim 10^{-4} - 10^{-6}$ с, $D \sim 10^{-10} - 10^{-12}$ см²/с). Вязкость углеводородной зоны мембран составляет, как правило, 1—2 пуаз, что говорит о ее жидкофазном состоянии, хотя и превышает на два порядка вязкость воды. Прочность мембран зависит от химического состава, внешних условий и может нарушаться за счет локальных механических дефектов, возникающих при сжатии. Среднее время жизни БЛМ в электрическом поле падает при увеличении напряжения на мембране (электрической пробой мембраны). Энергия мембраны зависит от поверхностного натяжения, т. е. от работы, которую нужно затратить на образование 1 см² поверхности липидного слоя. Если в мембране появляется дефект типа сквозной поры, то энергия мембраны будет зависеть от ее радиуса. Энергия уменьшится на величину, равную суммарному поверхностному натяжению на площади, занятой порой, а также за счет изменения электрической емкости мембраны при появлении в ней структурного дефекта. В результате оказывается, что зависимость энергии мембраны от радиуса дефекта имеет вид кривой с максимумом (рис. 13.2). Видно, что дефекты малого радиуса будут исчезать, однако дефекты с радиусом, большим критического (ϕ_0), будут необратимо увеличиваться, приводя к разрыву мембраны. Величина критического радиуса уменьшается с ростом наложенной на мембрану разности потенциалов, чем и объясняется увеличение вероятности механического разрыва мембран в электрическом поле.

Физико-химические свойства мембран сильно зависят от фазового состояния липидов, которое меняется при достижении критических температурных значений фазового перехода. Температура фазового перехода увеличивается с увеличением длины

цепи и уменьшается с увеличением числа двойных связей жирнокислотных остатков. Обычно в естественных условиях большинство природных липидов, содержащих ненасыщенные связи, находится в «жидком» состоянии. Точка фазового перехода для них лежит в области отрицательных температур. В гелеподоб-

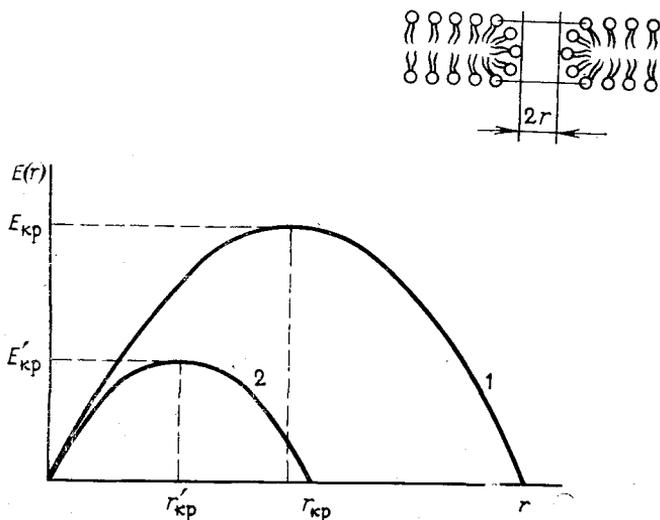


Рис. 13.2. Зависимость энергии дефекта в мембране $E(r)$ от его радиуса r в отсутствие электрического поля и при наложении разности потенциалов ϕ . 1 — при $\phi=0$, 2 — при $\phi>0$; вверху справа — изображение поры в бислое

ном состоянии углеводородные цепи находятся в трансконформации, а в жидкоподобном — они разупорядочены. При плавлении углеводородная цепь частично искривляется с образованием петли, или кинка (рис. 13.3). Увеличение числа кинков способствует разупорядоченности углеводородной зоны. Кинк может смещаться вдоль углеводородной цепи за счет синхронного поворота на 120° соответствующей последовательности С—С-связей. Подобное перемещение кинка является своеобразной диффузией свободного объема, внутри которого может происхо-

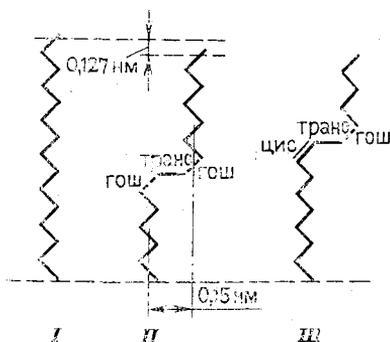
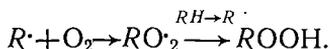


Рис. 13.3. Схематическое изображение углеводородных цепей в полностью транс-конфигурации (I), гош-транс-конфигурации (II), цис-транс-конфигурации (III). Кинк-блоки в углеводородных цепях мембран

дить перенос малых молекул через углеводородную зону.

Перекисное окисление липидов. Этот процесс, идущий с участием свободных радикалов, играет большую роль, изменяя физико-химическое состояние и свойства мембран. Свободнорадикальные продукты образуются в результате диссоциации C—H-связей, особенно если они расположены в соседнем положении с двойной связью. Перекисное окисление инициируется при действии активных форм кислорода (радикалы $O\cdot H$, $HO_2\cdot$, синглетный кислород 1O_2), которые вступают во взаимодействие с жирнокислотными цепями, отрывая от них водород. В результате на начальном этапе образуются свободнорадикальные продукты $R\cdot$, которые затем реагируют с кислородом. Эта реакция приводит уже к появлению гидроперекисей



Как видно, этот процесс сопряжен с отрывом водорода H от субстрата RH и присоединением H к радикалу $RO_2\cdot$. В итоге исходный свободнорадикальный инициирующий центр вновь регенерируется, давая тем самым начало цепному окислению липидов. Сами свободнорадикальные продукты могут погибать в реакциях рекомбинации или за счет действия антиокислительных защитных соединений. К последним относятся соединения фенольного типа (токоферол) или вещества, взаимодействующие с активными формами кислорода. Например, β -каротин, а также α -токоферол эффективно тушат синглетный кислород, дезактивируя его синглетно-возбужденное состояние. Другие антиокислители оказывают защитное химическое действие, так как, взаимодействуя с O_2 , они сами подвергаются окислению.

В биологических мембранах перекисному окислению подвергаются в основном непредельные фосфолипиды. В результате окисления липидов увеличивается вязкость мембран, так как при этом уменьшается количество жидких гидрофобных липидов, появляются поперечные межмолекулярные сшивки и увеличивается количество упорядоченных липидов с ограниченной подвижностью. В процессе перекисного окисления появляющиеся свободные радикалы R , $RO_2\cdot$, могут рекомбинировать друг с другом с выделением большой порции энергии (~ 70 — 100 ккал/моль). Этого достаточно для перевода продуктов реакции в электронное возбужденное состояние. Последующий переход возбужденных продуктов в основное состояние может сопровождаться испусканием кванта света хемилюминесценции.

Ионные равновесия. Движущей силой диффузии через мембрану является разность химических потенциалов (μ) этого вещества между областями, разделенными мембраной. Напомним (лекция 5), что химический потенциал равен

$$\mu = \mu_0 + RT \ln C, \quad (13.1)$$

где μ_0 — стандартный химический потенциал, C — концентрация вещества.

Если происходит перенос ионов, то их движение зависит не только от концентрации, но и от электрического потенциала (φ) на мембране. В этом случае пользуются понятием электрохимического потенциала ($\bar{\mu}$)

$$\bar{\mu} = \mu_0 + RT \ln C + ZF \varphi, \quad (13.2)$$

где Z — валентность иона, F — число Фарадея (96500 Кулон/моль). Непосредственно движущей силой переноса ионов является градиент электрохимического потенциала $d\bar{\mu}/dx$.

Основной энергетический барьер, который стоит на пути проникновения ионов в липидную мембрану из водной фазы, возникает из-за того, что диэлектрическая постоянная липидов $\epsilon \sim 2-3$, а в воде $\epsilon \sim 81$. Вследствие этого энергия иона как заряженной частицы радиуса r и заряда e , равная

$$E = e^2/2\epsilon r, \quad (13.3)$$

повышается в липидном слое. Отсюда следует, что коэффициент распределения концентраций иона между водной и липидной фазами должен быть очень мал:

$$\gamma = \frac{C_{\text{лип}}}{C_{\text{H}_2\text{O}}} \sim 10^{-20} - 10^{-30}, \quad (13.4)$$

где $C_{\text{лип}}$, $C_{\text{H}_2\text{O}}$ — концентрации иона в фазах у самой границы раздела.

Рассмотрим распределение электролита A^+B^- между липидной (2) и водной (1) фазами, у которого анион B^- и катион A^+ обладают разной липофильностью (пусть липофильность аниона B^- выше). Вблизи границы раздела концентрации анионов B^- в липидной фазе несколько превысит содержание анионов A^+ . Поэтому около границы раздела неполярная липидная фаза (2) несет отрицательный заряд и имеет более низкий потенциал, чем водная фаза (1). Однако в областях, далеких от поверхности раздела, концентрации A^+ и B^- равны, т. е. соблюдается условие электронейтральности объемов фаз $C_A = C_B$. В целом концентрация обоих видов ионов A^+ и B^- ниже в фазе (2) вследствие различий в диэлектрических проницаемостях.

На рис. 13.4 показаны профили распределения концентраций A^+ и B^- и профиль электрического потенциала вблизи поверхности раздела фаз. Как видно, в областях вблизи поверхности раздела имеются диффузионные слои, в каждом из которых концентрации A^+ и B^- неодинаковы и условие электронейтральности вблизи границы раздела не соблюдается. Соотношение концентраций электролита в двух фазах можно получить из условия равновесия на границе раздела фаз

$$\mu_{OA}^{(1)} + RT \ln C_A^{(1)} = \mu_{OA}^{(2)} + RT \ln C_A^{(2)} \quad (13.5)$$

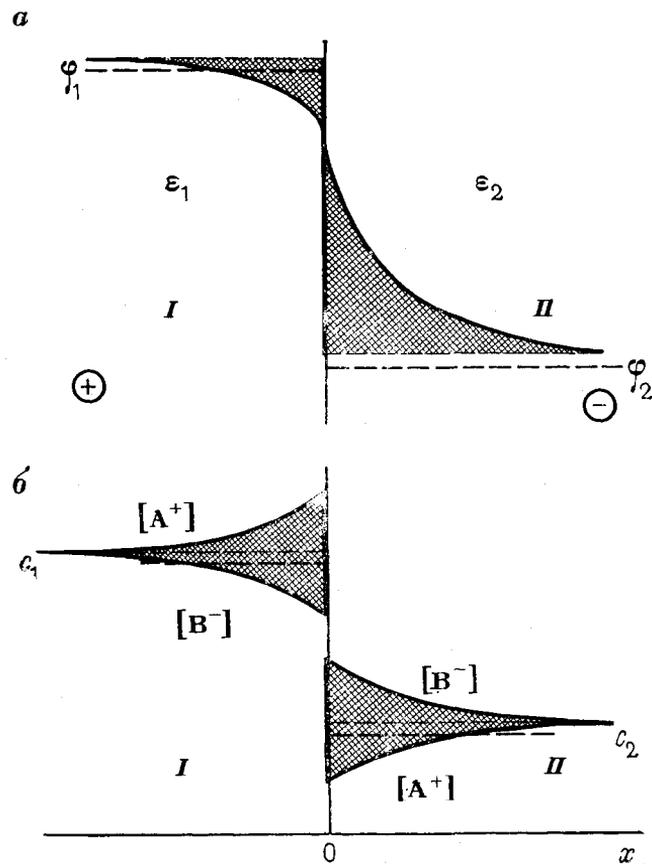


Рис. 13.4. Профили распределения потенциала и концентрации ионов (A^+ и B^+ на границе раздела фаз I и II. Фаза I — водный раствор ($\epsilon_1=80$), фаза II — масло ($\epsilon_2=2\div 3$), а — распределение потенциала (φ), б — распределение концентраций (C) катионов и анионов. C_1 , C_2 — концентрации электролитов в объеме фаз I и II

Здесь члены $F\varphi_1$ и $F\varphi_2$ отсутствуют, так как на самой границе потенциалы фаз равны $\varphi_1^0 = \varphi_2^0 = \varphi_0$. Отсюда с учетом выражения (13.4) $\gamma_A = C_A^{(2)} / C_A^{(1)}$ найдем, что для γ_A , а также аналогично для γ_B

$$\ln \gamma_{A^+} = \frac{\Delta\mu_{OA}}{RT}, \quad \ln \gamma_{B^-} = \frac{\Delta\mu_{OB}}{RT}, \quad (13.6)$$

где $\Delta\mu_{OA} = \mu_{OA}^{(1)} - \mu_{OA}^{(2)}$, $\Delta\mu_{OB} = \mu_{OB}^{(1)} - \mu_{OB}^{(2)}$.

При условии электронейтральности каждой фазы $C_A^{(1)} = C_B^{(1)} = C_1$ и

$$C_A^{(2)} = C_B^{(2)} = C_2, \quad \ln \frac{C_2}{C_1} = \frac{1}{2} (\ln \gamma_{A^+} + \ln \gamma_{B^-}),$$

или

$$\frac{C_2}{C_1} = \sqrt{\gamma_{A^+} \gamma_{B^-}}. \quad (13.7)$$

Отношение концентраций электролита в фазах зависит от γ_{A^+} и γ_{B^-} . Величина разности потенциалов $\Delta\varphi = \varphi_1 - \varphi_2$ между фазами зависит от разности электрохимических потенциалов обоих видов иона. Можно показать, что при условии электронейтральности каждой фазы

$$\Delta\varphi = \varphi_1 - \varphi_2 = \frac{1}{2F} (\Delta\mu_{OB} - \Delta\mu_{OA}) = \frac{2F}{RT} (\ln \gamma_{A^+} \ln \gamma_{B^-}). \quad (13.8)$$

Таким образом, из выражения (13.8) следует, что межфазная разность потенциалов возникает, только если коэффициенты распределения катионов и анионов различных ($\gamma_{A^+} \pm \gamma_{B^-}$). Характер падения потенциала вблизи границы зависит от распределения ионов в двойном электрическом слое в толщине мембраны. Анализ показывает, что значение электрического потенциала вблизи границы относительно объема фазы изменяется экспоненциально с расстоянием вдоль координаты x в толще мембраны

$$\varphi(x) = \varphi_0 e^{-\kappa|x|}, \quad (13.9)$$

где φ_0 — значение потенциала на границе раздела, κ — константа, зависящая от концентрации ионов в данной фазе и диэлектрической проницаемости. Основное падение потенциала (в e раз) происходит на расстоянии $x = 1/\kappa$, которое характеризует толщину двойного диффузионного слоя. Величина $\lambda = 1/\kappa$ называется длиной экранирования. Она падает при увеличении концентрации электролита в данной фазе. В разбавленных растворах толщина двойного диффузионного слоя достигает сотен ангстрем, а в концентрированных растворах — единиц ангстрем. Это значит, что в липидном слое, где концентрация ионов на несколько порядков меньше, чем в водной среде, длина экранирования намного больше. В случае тонкой мембраны, толщина которой намного меньше длины экранирования, скачок потенциала внутри мембраны практически отсутствует. В отсутствии внешнего поля потенциал внутри тонкой мембраны постоянен по всей ее толщине (рис. 13.5). Поэтому значения потенциала в тонкой незаряженной мембране не отличаются от уровня потенциала окружающих растворов на любом удалении от мембраны. Именно такая ситуация имеет место в незаряженных бислойных липидных мембранах, толщина которых состав-

ляет 70—100 Å. Если к тонкой незаряженной мембране приложить внешнее поле, то внутри мембраны потенциал будет меняться линейно, т. е. градиент приложенного потенциала в мембране постоянен по всей ее толщине: $d\varphi/dx = \text{const}$. Однако если поверхность тонкой мембраны исходно заряжена и имеет

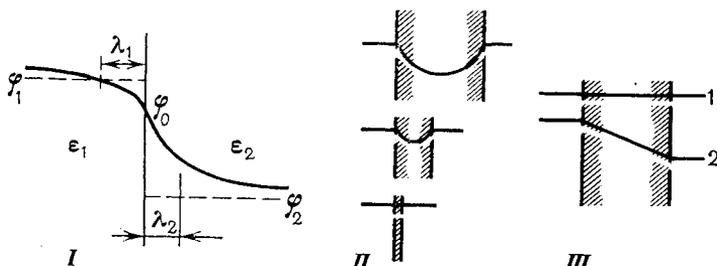


Рис. 13.5. Профили распределения потенциала на границе раздела фаз. (I) в мембранах разной толщины (II); в тонкой мембране в отсутствии внешнего поля (III, 1) и при наложении разности электрических потенциалов (III, 2): φ_1 , φ_2 — электрические потенциалы в объеме фаз; φ_0 — электрический потенциал на границе раздела; ϵ_1 , ϵ_2 — диэлектрическая проницаемость двух фаз; λ_1 , λ_2 — длина экранирования для первой и второй фаз

фиксированные заряды, то в пространстве около поверхности образуется двойной электрический слой. В этом слое противоионы из раствора будут удерживаться электростатическим притяжением мембранных зарядов. Такому притяжению препятствует тепловое движение ионов, стремящееся выровнять их концентрации на поверхности и в объеме. В результате поверхностный потенциал на мембране будет сложным образом зависеть от плотности поверхностного заряда, равновесной концентрации электролита в растворе и температуры.

Поверхностный потенциал мембраны играет еще и важную роль в биоэлектрохимических процессах. В экспериментах обычно измеряют близкую величину — электрокинетический потенциал ζ (дзета-потенциал), или потенциал скольжения. Он определяется с учетом того, что первый слой ионов со своими гидратными оболочками и первый слой молекулы воды, смачивающих твердую фазу, удерживаются около заряженной поверхности при движении мембранной частицы относительно жидкости. Электрокинетические явления (электроосмос, электрофорез, потенциал течения, потенциал оседания) обусловлены мембранным поверхностным зарядом.

Доннановское равновесие — это вид ионного равновесия между фазами, когда одна из фаз несет заряженные частицы, не способные перейти в другую фазу. Допустим, что две водные фазы, в каждой из которых растворен электролит A^+B^- , разделены мембраной, проницаемой для электролита. Пусть в од-

ной из фаз (фаза 2) имеются положительные фиксированные заряды Q , которые не могут проходить через мембрану. При условии равновесия для подвижного иона одного типа электрохимические потенциалы (13.2) в обоих растворах (1 и 2) одинаковы

$$RT \ln C_{A_1} + ZF \varphi_1 = RT \ln C_{A_2} + ZF \varphi_2 \quad (13.10)$$

и

$$RT \ln C_{B_1} - ZF \varphi_1 = RT \ln C_{B_2} - ZF \varphi_2.$$

Из условий равновесия (13.10) получаем уравнение для разности потенциалов

$$\varphi_1 - \varphi_2 = \frac{RT}{F} \ln \frac{C_{A_2}}{C_{A_1}} = - \frac{RT}{F} \ln \frac{C_{B_2}}{C_{B_1}}, \quad (13.11)$$

которое называется уравнением Нернста для равновесного потенциала на мембране. Оно показывает, что равновесный потенциал на мембране определяется соотношением концентраций электролита в обеих фазах. Если $C_{A_1} = C_{B_1} = C_{A_2} = C_{B_2} = C$, то $\Delta\varphi = 0$. Из уравнения (13.11) следует соотношение

$$C_{A_2} \cdot C_{B_2} = C_{A_1} \cdot C_{B_1} = C^2. \quad (13.12)$$

Влияние недиффундирующего иона Q приводит к тому, что на мембране появляется разность потенциалов, даже если концентрации электролита по обе стороны мембраны исходно были равны. В самом деле, из условия электронеutrальности первой фазы следует, что

$$C_{A_1} = C_{B_1} = C, \quad (13.13)$$

а для второй фазы это же условие в присутствии Q имеет вид

$$C_{A_2} + Q = C_{B_2}. \quad (13.14)$$

Очевидно, что во второй фазе

$$C_{A_2} < C_{B_2},$$

и так как согласно (13.12, 13.13), $C_{A_2} \cdot C_{B_2} = C^2_{A_1} = C^2$, то

$$C_{A_2} < C_{A_1}.$$

Значит, заряд Q в фазе 2 компенсируется повышенным содержанием в ней анионов B_2^- при более низком содержании катионов A_2^+ . В этом случае возникает доннановская разность потенциалов, которая равна

$$\Delta\varphi_D = \varphi_2 - \varphi_1 = RT \ln \frac{C_{A_1}}{C_{A_2}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{C}{C_{A_2}} > 0,$$

где $C_{A_2} < C$. Величина $\Delta\varphi_D$ может достигать довольно больших значений, когда при $Q \gg C$ в фазе 2 аккумулируются анионы B_2^- до концентрации, намного большей, чем концентрация C электролита в водном растворе.

Лекция 14. ПАССИВНЫЙ ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ

Пассивное прохождение веществ через мембраны из одной фазы в другую происходит под действием движущих сил-градиентов концентраций или потенциалов, существующих между фазами.

Транспорт неэлектролитов происходит по механизмам диффузии. Поток вещества I в направлении оси x пропорционален градиенту концентрации $\frac{dC}{dx}$ (закон Фика):

$$I = -D \frac{dC}{dx}, \quad (14.1)$$

где D — коэффициент диффузии [$\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$], зависящий от температуры и подвижности u вещества в среде:

$$D = RTu. \quad (14.2)$$

В случае тонкой мембраны градиент концентрации постоянен $\frac{dC}{dx} = \text{const}$ и движущая сила равна разности концентраций

C_1 и C_2 в омывающих мембрану растворах

$$I = P(C_1 - C_2),$$

где P — коэффициент проницаемости мембраны для данного вещества. Проницаемость зависит от коэффициентов диффузии D и распределения γ вещества между водной и липидной фазами и уменьшается с увеличением толщины h мембраны

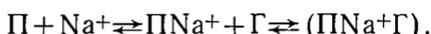
$$P = \frac{D\gamma}{h} = \frac{RTu\gamma}{h}. \quad (14.3)$$

Существует определенная корреляция между проникающей способностью веществ и их растворимостью в липидах, что справедливо в случае больших гидрофобных молекул. Однако малые гидрофильные молекулы могут проникать по водным порам или перемещаться вместе с диффузией кинков через углеводородную зону. Неэлектролиты проникают в гидрофобную часть мембраны, или в узкую пору, при условии, что они теряют свою гидратную оболочку. Необходимо затратить определенную энергию, чтобы «оторвать» диполи воды от полярных групп молекулы ($-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$). Это определяет причину сильной температурной зависимости коэффициента проницаемости

мембран для ряда неэлектролитов. Другим видом пассивного транспорта является облегченная диффузия аминокислот и сахаров. Она отличается от простой диффузии высокой специфичностью по отношению к транспортируемому веществу, насыщением скорости диффузии при увеличении концентрации вещества, чувствительностью к действию определенных ингибиторов. Все это говорит о сходстве облегченной диффузии с ферментативными процессами и указывает на участие переносчиков в этом процессе. Формально начальная скорость переноса вещества описывается уравнением, аналогичным уравнению Михаэлиса—Ментен:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot S_0}{K_M + S_0}, \quad (14.4)$$

где S_0 — концентрация вещества в наружном растворе. Концентрация вещества внутри $S_i = 0$ в начальный момент времени. По мере роста S_0 все переносчики оказываются связанными и дальнейшего увеличения скорости диффузии уже не происходит. Движущей силой транспорта с участием переносчика будет градиент химического или электрохимического потенциала переносимого вещества. Существуют переносчики, которые одновременно переносят и аминокислоту и ион, фиксируя их на двух центрах связывания (например, в эритроцитах). Таким же образом происходит транспорт глюкозы в сердечной мышце с образованием комплекса переносчика П с Na^+ и глюкозой



Движение этого комплекса облегчается за счет взаимодействия заряда Na^+ с электрическим полем. Подчеркнем, что в пассивном транспорте энергия метаболизма не тратится на поддержание градиентов. При выравнивании градиентов в процессе диффузии в системе наступает равновесие и облегченная диффузия прекращается. В отличие от этого в активном транспорте поддержание градиентов — движущих сил транспорта — происходит за счет энергии сопряженных метаболических процессов.

Транспорт ионов через искусственную липидную мембрану, которая рассматривается как гомогенная непрерывная среда, носит непрерывный характер. Согласно соотношениям Онзагера, пропорциональности между потоками и их движущими силами (лекция 5), поток I заряженных ионов пропорционален градиенту электрохимического потенциала ($d\bar{\mu}/dx$) в направлении оси x . Он также зависит от подвижности u и концентрации C ионов

$$I = C \cdot u \left(- \frac{d\bar{\mu}}{dx} \right). \quad (14.5)$$

Подставляя в (14.5) выражение для электрохимического потенциала

$$\bar{\mu} = \mu_0 + RT \ln C + ZF \varphi,$$

найдем с учетом $\frac{d \ln C}{dx} = \frac{1}{C} \frac{dC}{dx}$, что

$$I = -uRT \frac{dC}{dx} - uCZF \frac{d\varphi}{dx}. \quad (14.6)$$

Выражение (14.6) называется уравнением Нернста—Планка пассивного транспорта ионов в поле электрохимического потенциала. Решение этого уравнения возможно при двух упрощающих условиях. Во-первых, возможно, что справедливо условие электронейтральности не только фаз, разделенных мембраной, но также и самой мембраны. Это осуществляется, когда концентрации анионов и катионов равны в любой плоскости по оси x ($C_- = C_+$). В этом случае между двумя растворами электролита возникнет диффузионный электрический потенциал, который обязан своим происхождением различной подвижности катионов (u_+) и анионов (u_-). Уравнение Гендерсона для диффузионного потенциала $\Delta\varphi = \varphi_2 - \varphi_1$ имеет вид

$$\Delta\varphi = \frac{u_+ - u_-}{u_+ + u_-} \cdot \frac{RT}{F} \ln \frac{C_2}{C_1}. \quad (14.7)$$

Например, при соприкосновении двух растворов NaCl вследствие большей подвижности иона хлора $u_{Cl} \approx 1,5 u_{Na}$ раствор с меньшей концентрацией приобретает отрицательный потенциал по отношению к концентрированному раствору. При отношении $C_1/C_2 \sim 10$ величина $\Delta\varphi_{\text{диф}}$ в случае NaCl может достигь ~ 12 мВ.

Уравнение Гендерсона, однако, неприменимо для описания потенциала на мембранах клетки, так как на тонких мембранах, к которым относятся клеточные мембраны, не соблюдается условие электронейтральности по всей толщине мембраны. В этом случае может быть справедливо условие линейного изменения потенциала по всей толщине мембраны $d\varphi/dx = \text{const}$, которое осуществляется именно в тонких мембранах. Тогда уравнение Нернста—Планка можно решить и тем самым получить зависимость суммарного пассивного потока J иона от разности потенциала $\Delta\varphi$ на мембране и концентрации этого иона C_1 и C_2 в фазе самой мембраны на ее краях

$$I = \vec{i} - \overleftarrow{i} = \frac{ZF \Delta\varphi u}{h} \cdot \frac{C_1 - C_2 \exp(ZF \Delta\varphi/RT)}{1 - \exp(ZF \Delta\varphi/RT)}. \quad (14.8)$$

В суммарный поток J дают вклад два односторонних противоположно направленных потока \vec{i} и \overleftarrow{i} . Поток \vec{i}

$$\vec{i} = \frac{ZF \Delta\varphi u}{h} \cdot \frac{C_1}{1 - \exp(ZF \Delta\varphi/RT)}$$

— прямой односторонний поток, направленный через мембрану из наружного омывающего раствора электролита с концентрацией C_0 . Поток \vec{i}

$$\vec{i} = \frac{ZF \Delta \varphi u}{h} \cdot \frac{C_2 \exp(ZF \Delta \varphi / RT)}{1 - \exp(ZF \Delta \varphi / RT)}$$

— обратный односторонний поток из внутреннего раствора с концентрацией C_i в наружный раствор через мембрану.

Концентрации ионов (C_1 и C_2) на краях в фазе самой мембраны пропорциональны соответственно концентрациям в наружном и внутреннем омывающих растворах (C_0 и C_i):

$$C_1 = \gamma C_0,$$

$$C_2 = \gamma C_i.$$

Тогда уравнение для пассивного потока через мембрану примет вид

$$I = \frac{ZF \varphi}{RT} \rho \frac{C_0 - C_i \exp(ZF \Delta \varphi / RT)}{1 - \exp(ZF \Delta \varphi / RT)}, \quad (14.9)$$

где $\rho = uRT \gamma / h$ — коэффициент проницаемости. Выражение (14.9) известно как уравнение Гольдмана в приближении постоянного поля ($d\varphi/dx = \text{const}$). Односторонние потоки \vec{i} и \overleftarrow{i} являются независимыми, если каждый из них определяется только «своей» концентрацией, т. е. концентрацией раствора, откуда направлен поток. В этом случае отношение независимых односторонних потоков будет равно

$$\frac{\vec{i}}{\overleftarrow{i}} = \frac{C_0}{C_i \exp(ZF \Delta \varphi / RT)}. \quad (14.10)$$

Соотношение (14.10) известно как критерий Уссинга—Теорелла независимости односторонних потоков. Оно используется для доказательства пассивного характера транспорта ионов. Уравнение Гольдмана предсказывает нелинейную зависимость трансмембранного потока ионов от разности потенциалов на мембране. В равновесии, когда суммарный ток равен нулю

$$J = \vec{i} - \overleftarrow{i} = 0,$$

из (14.9) следует, что

$$C_0 = C_i \exp(ZF \Delta \varphi / RT)$$

и соответственно равновесное значение потенциала

$$\Delta \varphi = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{C_0}{C_i}$$

определяется отношением концентраций в наружной C_0 и внутренней C_i средах. Если через мембрану одновременно диффундируют разные ионы, то их потоки дают вклад в суммарный

процесс транспорта. В равновесии, когда электрический ток через мембрану не течет, сумма потоков отдельных ионов равна нулю. На клеточных мембранах большое значение имеет перенос ионов Na^+ , K^+ , Cl^- . В этом случае условием равновесия будет

$$J_{\text{Na}} + J_{\text{K}} + J_{\text{Cl}} = 0,$$

где каждый из потоков выражается уравнением (14.9). Суммирование выражений для потоков ионов Na , Cl , K дает

$$P_{\text{K}}[\text{K}_0] - P_{\text{K}}[\text{K}_i] \exp(F \Delta\phi/RT) + P_{\text{Na}}[\text{Na}_i] \exp(F \Delta\phi/RT) - P_{\text{Cl}}[\text{Cl}_i] - P_{\text{Cl}}[\text{Cl}_0] \exp(F \Delta\phi/RT) = 0.$$

Отсюда можно найти выражение для равновесного мембранного потенциала или клеточного потенциала покоя

$$\Delta\phi = \frac{RT}{F} \frac{P_{\text{K}}[\text{K}_0] + P_{\text{Na}}[\text{Na}_0] + P_{\text{Cl}}[\text{Cl}_i]}{P_{\text{K}}[\text{K}_i] + P_{\text{Na}}[\text{Na}_i] + P_{\text{Cl}}[\text{Cl}_0]}. \quad (14.11)$$

Проницаемости ионов Na , K , Cl различны, и, следовательно, неравномерное распределение ионов по обе стороны мембраны и является основной причиной возникновения потенциала покоя. Отношение проницаемостей таково

$$P_{\text{K}}:P_{\text{Na}}:P_{\text{Cl}} = 1:0,04:0,05,$$

что мембрана практически непроницаема для Na^+ по сравнению с K^+ .

Величины потенциала покоя в клетке достигают, как правило, -70 мВ. В интактных аксонах это значение близко к равновесному потенциалу для ионов K^+ . Можно упрощенно считать, что трансмембранный потенциал покоя в этих случаях определяется в основном условиями равенства электрохимических потенциалов ионов K^+ , равновесная концентрация которых в клетке намного превышает их равновесную концентрацию в наружной среде. Вместе с тем низкий уровень концентрации ионов Na^+ в клетке далек от того, который должен был бы установиться при условии равновесия. Очевидно, для поддержания низкого неравновесного уровня концентрации Na^+ в клетке необходим какой-то механизм активного выведения Na^+ наружу, или, как говорят, система Na -насоса. Одним из указаний на существование Na -насоса являются опыты по переносу ионов через кожу лягушки. Если разделить две камеры с одинаковыми растворами Рингера кожей лягушки, то между ее наружной и внутренней поверхностями возникает разность потенциалов около 100 мВ (внешняя поверхность отрицательна) (рис. 14.1).

Подавая от внешнего источника ЭДС противоположного направления, можно скомпенсировать разность потенциалов до нуля. Тогда в системе должно наступить равновесие, поскольку теперь отсутствуют градиенты не только концентраций, но и потенциала между камерами, разделенными кожей лягушки.

В этом случае, согласно критерию Уссинга (14.10), односторонние потоки должны быть равны: $\vec{i} = \overleftarrow{i}$ при $C_0 = C_i$ и $\Delta\phi = 0$. Однако в прямых экспериментах с меченым Na^+ оказалось, что в этих условиях поток Na^+ от наружной поверхности к внутренней поверхности кожи намного превышает поток Na^+ в противоположном направлении. Этот процесс транспорта Na^+ от наружной слизистой к внутренней серозной оболочке представляет собой активный транспорт. У некоторых растений величина потенциала покоя достигает -200 мВ, что намного превышает равновесный потенциал ионов K^+ и объясняется активным выведением наружу ионов H^+ из цитоплазмы.

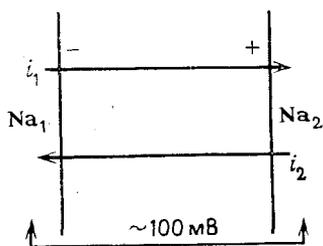


Рис. 14.1. Принципиальная схема измерения тока короткого замыкания на коже лягушки

Лекция 15. КАНАЛЫ И ПЕРЕНОСЧИКИ. АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ

Прежде чем перейти к рассмотрению активного транспорта, остановимся на механизмах прохождения ионов через мембрану.

Каналы. Биологическая мембрана содержит ионные каналы, представляющие собой липопротеиновые комплексы сложной структуры. В узких каналах (натриевый $3,1 \times 5,1 \text{ \AA}$, калиевый $4,5 \times 4,5 \text{ \AA}$) возможно однорядное движение ионов, которые могут взаимодействовать друг с другом и с молекулярными группами канала. При поступлении иона в канал происходит замещение молекул воды гидратной оболочки иона на полярные группы полости канала. Увеличение свободной энергии иона при дегидратации с избытком компенсируется энергией его взаимодействия с полярными группами канала. В результате общая энергия иона снижается, что и облегчает его прохождение через канал. Наличие полярных групп, а также фиксированных анионных центров в канале приводит за счет их кулоновских взаимодействий с ионом к снижению энергетического барьера перехода иона из раствора в канал. Лучше всего проходят через канал ионы, которые прочно связываются электростатическими силами с анионным центром. Например, с небольшим отрицательным анионным центром более прочно после потери гидратной оболочки будет связываться меньший по размеру катион Na^+ по сравнению с катионом K^+ . В то же время радиус гидратированного иона Na^+ больше, чем K^+ , и без потери гидратной оболочки ион Na^+ хуже проходит через относительно широкие поры в мембране. Наличие в канале фиксированных анионных центров, притягивающих катионы, облегчает их прохождение через канал, снижая энергию иона. На рис. 15.1 и 15.2 приведены энергетические профили Na^+ - и K^+ -каналов. Скорость проведения Na^+ -канала достигает 10^7 ионов/с. Через Na^+ -канал могут проходить и различные органические катионы размером не больше $3 \times 5 \text{ \AA}$. В качестве анионного центра могут выступать атомы кислорода группы COO . Калиевые каналы имеют широкое устье ($>8 \text{ \AA}$) со стороны цитоплазмы, которое может блокироваться тетраэтиламмонием.

Однорядный транспорт ионов через канал обладает характерными особенностями. Ион относительно долго задерживается в каждой потенциальной яме. Это значит, что второй ион не может попасть в занятую потенциальную яму из-за электро-

статического взаимодействия (отталкивания) с уже находящимся там ионом. Перескоки между ямами совершаются под действием тепловых флуктуаций. Приложенное внешнее электрическое поле изменяет энергию иона и тем самым влияет на вероятность перескока. Выход из канала иона, связанного анионным центром, облегчается при появлении на входе канала дру-

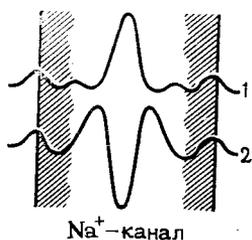


Рис. 15.1. Энергетический профиль натриевого канала возбудимых мембран

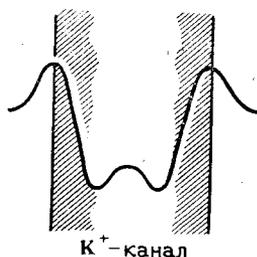


Рис. 15.2. Энергетический профиль калиевого канала возбудимых мембран

того иона вследствие их ион-ионного электростатического отталкивания. Проводимость канала зависит от того, насколько заполнены участки «входа» и «выхода» канала, связывающие ионы. При высоких концентрациях электролита оба участка связывания могут быть заполнены ионами, что приведет к блокировке канала и насыщению его проводимости. Ясно, что изменение числа частиц в канале изменяет и энергетический профиль канала вследствие кулоновских взаимодействий. Однако конформационные перестройки белка, формирующего ионный канал, могут также изменять высоту энергетического барьера в результате переориентации полярных групп.

Переносчики. Перенос иона через мембрану осуществляется также с помощью транспорта ионофоров (переносчиков). Ионофоры могут образовывать комплексы с ионом либо формировать поры в мембране, заполненные водой (каналы). Закономерности этих процессов изучены на бислойных липидных мембранах. Энергия комплекса ион — переносчик значительно ниже энергии дегидратированного иона. Комплекс ионофора с ионом образуется на одной стороне мембраны, а затем перемещается на другую, где происходит освобождение иона и возвращение ионофора. Типичным подвижным переносчиком является валиномицин, который транспортирует K^+ . Катион калия входит во внутреннюю полость валиномицина, причем образовавшаяся структура стабилизируется за счет взаимодействия иона с 6—8 по-

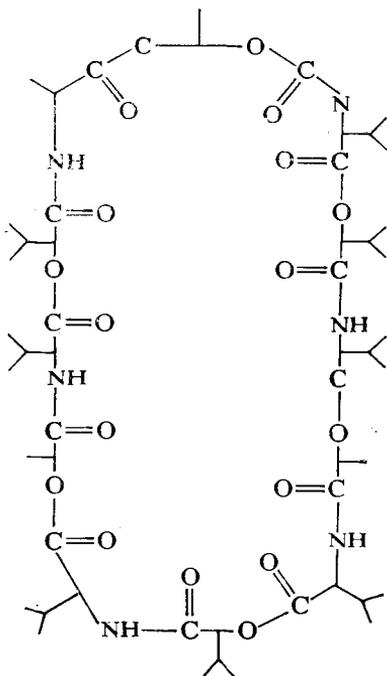


Рис. 15.3. Химическое строение молекулы валиномицина — ионофора

лярными группами CO (рис. 15.3), которые заменяют гидратную оболочку иона. Ион Na^+ , обладающий меньшим радиусом, не в состоянии эффективно взаимодействовать с кислородами карбонильных групп. Молекула валиномицина переносит через БЛМ $\sim 10^4$ ионов/с. Другой переносчик — нигерицин — образует с ионами комплексы, в которых молекула находится в свернутой конформации. Нигерицин может переносить и ионы H^+ , являясь слабой кислотой. Он индуцирует в БЛМ и биологических мембранах обмен H^+ на K^+ . Молекула ионофора может образовывать комплекс, имеющий водную пору. Внешняя часть молекул в поре гидрофобна, а внутрь канала обращены хорошо поляризуемые группы. Наиболее известен как каналобразующий ионофор грамицидин. Молекула грамицидина А, сформированная пятнадцатью гидрофобными аминокислотами, находясь в мембране, сворачивается в спиралевидную структуру. Она представляет собой полый цилиндр длиной около 30 Å и диаметром поры около 5—8 Å. По такому каналу может переноситься около 10^7 — 10^8 ионов/с. При входе иона в грамицидиновый канал происходит частичное замещение воды гидратной оболочки на карбонильные группы, обращенные внутрь поры. Ионные каналы обладают характерными флуктуациями проводимости вследствие их открывания и закрывания, что отличает канальную проводимость от транспорта с участием переносчиков. Анализ этих флуктуаций позволяет оценить среднее время жизни канала в открытом состоянии и проводимость одиночного канала. Очевидно, что при стохастическом характере открывания и закрывания канала значение его проводимости (g) колеблется около некоторого среднего значения (\bar{g}) со средним квадратичным отклонением, или дисперсией σ^2

$$\sigma^2 = \langle (g - \bar{g})^2 \rangle.$$

Напомним, что проводимость (g) канала для данного иона

пропорциональна его проницаемости P и концентрации C

$$g \sim PC.$$

Статистический анализ шумов процессов открывания-закрывания каналов показывает, что среднее значение проводимости мембраны связано с проводимостью (h_0) её одиночного канала простым соотношением

$$\sigma^2 = h_0 g.$$

Отсюда можно определить значение h_0 одиночного канала и τ_0 — время жизни канала в открытом состоянии, которое может варьировать от миллисекунд до секунд.

Активный транспорт. Системы активного транспорта обеспечивают перенос ионов против градиента электрохимического потенциала и используют для этого энергию метаболизма (АТФ, сопряженные окислительно-восстановительные процессы). Активный транспорт в нервных клетках осуществляется Na , K -АТФазой, локализованной в плазматических мембранах. Принцип действия Na , K -АТФазы состоит в том, что за счет освобождающейся при гидролизе АТФ энергии в ней происходят конформационные изменения, которые сопровождаются переносом ионов Na из клетки во внеклеточную среду и одновременно K^+ — в обратном направлении. На рис. 15.4 изобра-

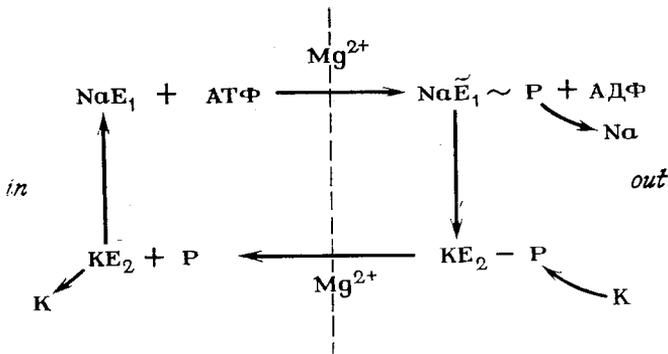


Рис. 15.4. Схема функционирования Na , K -АТФазы

жена схема функционирования Na , K -АТФазы, состоящей из двух полипептидных субъединиц (малой и большой). На внутренней стороне мембраны в присутствии Na и Mg -АТФ происходят фосфорилирование белка и образование комплекса $\text{NaE}_1 \sim \text{P}$, в котором белок фермента E находится в конформационно-напряженном состоянии, и переход его на внешнюю сторону мембраны. Затем дефосфорилирование белка на внешней стороне мембраны изменяет сродство фермента к ионам Na^+ и K^+ . Теперь

ионы K^+ лучше связываются с белком, ионы выходят во внешнюю среду, а фермент переходит в новое конформационное состояние (KE_2), где у него высокое сродство к K^+ . Затем комплекс KE_2 мигрирует во внутреннюю среду, где отщепляется K^+ , а фермент возвращается в исходное состояние E_1 , теперь он вновь вступает в цикл превращений.

Стабильный фосфорилированный комплекс E_1-P связывает три иона Na^+ , а в состоянии E_2 — два иона K^+ . Таким образом, энергия АТФ тратится на создание такого конформационного напряженного состояния комплекса $NaE_1 \sim P$, где сродство к Na^+ понижается, а возрастает сродство к K^+ . Замена в этом состоянии 3 Na^+ на 2 K^+ снимает напряжение. Таким образом, за счет энергии АТФ происходит упорядоченное изменение сродства ион-связывающих центров фермента к катионам. Смещение в мембране субъединиц, несущих ионы, осуществляется в результате тепловых колебаний. Высказывается предположение, что ион-связывающая ячейка фермента содержит координационную сферу с 12 атомами кислорода. Известно, что 4 атома кислорода могут образовывать Na^+ -специфическую ячейку, а 6 атомов кислорода — K^+ -специфическую ячейку. Перегруппировка этих 12 атомов кислорода из состояния, где связываются 3 Na^+ , 4 атома кислорода \times 3 иона Na^+ , в состояние, где связаны 2 K^+ , 6 атомов кислорода \times 2 иона K^+ , требует конформационной перестройки белка и соответственно энергии АТФ. K - Na -АТФаза работает в электрогенном режиме, так как обмен 3 ионов Na на 2 иона K^+ создает дополнительную разность потенциалов на мембране.

В мембранах существует также Ca^{2+} -зависимая АТФаза, имеющая ряд особенностей, сходных с Na , K -АТФазой. Ее рабочий цикл также включает связывание Ca^{2+} и АТФ с образованием конформационно неустойчивого состояния, в котором изменяется сродство белка к ионом Ca за счет энергии макроэргической фосфатной связи. Как и в случае Na , K -АТФазы, изменение сродства здесь обусловлено, по-видимому, изменением расположения полярных групп, связывающих Ca^{2+} в координационной сфере центра фермента.

Активный транспорт H^+ может проходить по H^+ -каналам H^+ -АТФазы, по которым они переносятся к активному центру, где осуществляется синтез — гидролиз АТФ.

Механизм самого переноса H^+ до конца неясен. Предполагается эстафетная передача протонов по системе водородных связей, которая сопровождается взаимным смещением донорно-акцепторных групп. Структура энергетических барьеров, определяющая скорость и направление переноса H^+ в H^+ -канале, зависит от его конформационного состояния. Соответственно модификацию энергетического профиля иона в канале можно осуществить за счет энергии АТФ, кванта света (H^+ -канал в бактериородопсине), окислительно-восстановительных реакций.

Лекция 16. ТРАНСПОРТ ИОНОВ В ВОЗБУДИМЫХ МЕМБРАНАХ

Потенциал действия. В состоянии покоя соотношение проницаемостей калия и натрия составляет $P_K : P_{Na} = 1 : 0,04$, т. е. $P_{Na} \ll P_K$. Это обуславливает приближение значений потенциала покоя к равновесному потенциалу для K^+ в невозбужденной мембране. Внутреннее содержимое нервного волокна в состоянии покоя заряжено отрицательно по отношению к наружному раствору, что определяется направлением движения K^+ наружу из аксоплазмы. Потенциал покоя согласно уравнению Гольдмана равен

$$\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K_o] + P_{Na} [Na_o]}{P_K [K_i] + P_{Na} [Na_i]}$$

При возбуждении мембраны нервного волокна в ней возникают электрические импульсы. Одиночный нервный импульс — потенциал действия — длится около 1 мс и распространяется по волокну со скоростью 1—100 мс. Во время развития потенциала действия наблюдается быстрое смещение значений потенциала внутренней части волокна от отрицательных —70 мВ до положительных значений +40—+50 мВ (деполяризация) и последующий возврат к прежним значениям с кратковременной стадией гиперполяризации (рис. 16.1). Реверсия мембранного потенциала во время развития импульса вызвана резким изменением проницаемостей мембраны для ионов, так что на гребне спайка

$P_K : P_{Na} = 1 : 20$, т. е. $P_{Na} \gg P_K$.

Таким образом, оказывается, что проницаемость мембраны для ионов зависит от приложенного мембранного потенциала. Во время развития спайка поток ионов Na^+ , направленный внутрь, вызывает деполяризацию до тех пор, пока потоки Na^+

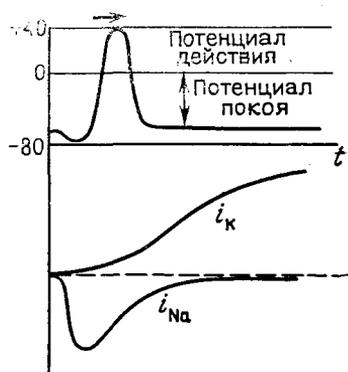


Рис. 16.1. Возникновение импульса потенциала действия (ПД) в результате местной деполяризации

внутри и наружу сравниваются, а потенциал на мембране приближается к равновесному для ионов Na. После этого происходит инактивация Na-каналов, прекращение потока Na внутрь. Одновременно увеличивается проницаемость для K, который выходит теперь наружу по градиенту своего электрохимического потенциала. В этом процессе мембрана реполяризуется до тех пор, пока выход K не прекратится, а потенциал на мембране приблизится к равновесному калиевому потенциалу. Реполяризация проходит через быструю стадию гиперполяризации. Потенциал на мембране вновь достигает уровня потенциала покоя, однако это происходит в условиях повышенной концентрации ионов Na и пониженной концентрации ионов K внутри клетки. Указанные отклонения от распределения ионов на покоящейся мембране могут нарастать при многократном прохождении нервных импульсов. В этих условиях постоянный уровень внутриклеточных концентраций K^+ и Na^+ поддерживается Na-, K-АТФазой, выводящей Na^+ наружу в обмен на поступление K^+ .

Проводимость каналов. Воротные токи. Изменение потоков Na^+ и K^+ (i_{Na} и i_K) во время потенциала действия (рис. 16.1) обеспечивается двумя типами ионных каналов для Na и K, проводимость которых по-разному меняется в зависимости от электрического потенциала на мембране. Na-проводимость быстро нарастает и затем быстро экспоненциально уменьшается. Калиевая проводимость нарастает по S-образной кривой и за 5—6 мс выходит на постоянный уровень. Восстановление натриевой проводимости до исходных значений происходит в 10 раз быстрее, чем калиевой проводимости. Вопрос о том, каким образом проводимость ионных каналов, управляемая электрическим полем, является в биофизике одним из центральных мембранных процессов. В модели Ходжкина—Хаксли предполагается, что проводимость для ионов Na и K регулируется некоторыми положительно заряженными управляющими частицами, которые перемещаются в мембране при изменениях электрического поля. Смещение положения этих частиц в мембране зависит от приложенного потенциала и соответствующим образом открывает или закрывает ионный канал. Считается, что в случае калиевой проводимости имеются четыре активирующие канальную проводимость частицы. В случае Na-канала предполагается наличие трех активирующих частиц, необходимых для открывания, и одной инактивирующей частицы — для закрывания канала. На основе этих предположений удалось построить математическую модель, с высокой точностью воспроизводящую нервный импульс. Главное достижение состоит в разделении трансмембранных токов на отдельные компоненты (i_{Na} и i_K) и в экспериментальном изучении их свойств. В функциональной структуре канала были выделены элементы, ответственные за механизмы селекции ионов (селективный фильтр), активации (активационные ворота) и инактивации канала (инактивационные ворота) (рис. 16.2). Движение заряженных управляющих

частиц в канале (воротных частиц) обнаруживается экспериментально по возникновению воротных токов. Они появляются в результате смещения частиц в мембране под влиянием наложенного на мембрану электрического импульса. Удалось обнаружить воротные токи смещения, связанные с частицами, от-

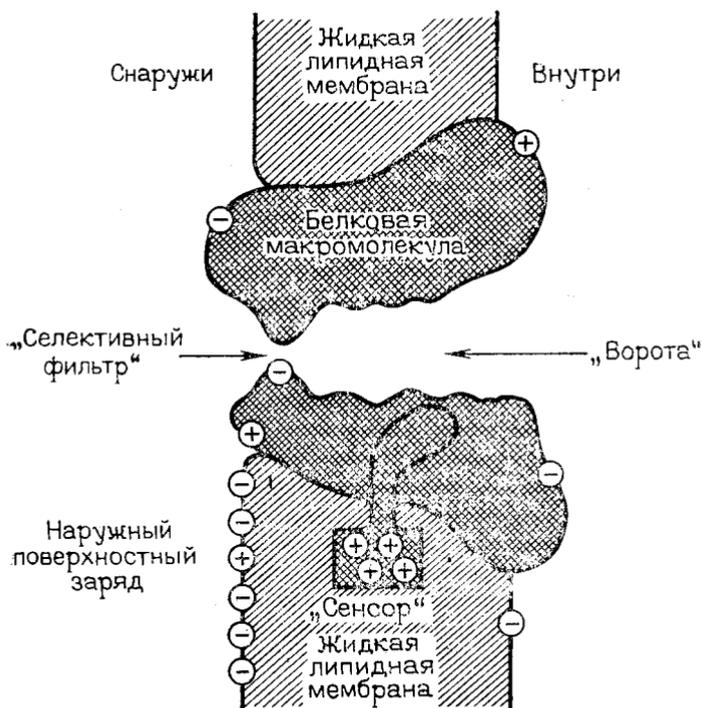


Рис. 16.2. Строение ионного канала (по Хилл, 1981)

рывающими Na-канал. Вместе с тем предположение, что перескок нескольких заряженных групп должен происходить через всю толщу мембраны, представляется маловероятным. Поэтому выдвигается другая интерпретация природы воротных токов. Предполагается, что токи смещения обусловлены не трансмембранным перескоком заряженных частиц, а кооперативным изменением ориентации диполей, выстилающих внутреннюю полость канала.

Полярные группы, определяющие дипольное окружение иона в канале, влияют на энергию иона и на прохождение его через канал. Если под влиянием деполяризующего электрического импульса изменяется их ориентация, то это вызовет смещение заряженных групп и изменение проводимости канала. Процесс переориентации диполей может носить кооперативный характер

и быть достаточно резким. В этом случае энергия, необходимая для переориентации каждого элементарного диполя, должна зависеть не только от его собственной энергии, но и от доли диполей, уже изменивших свою ориентацию. Иными словами, по мере изменения ориентации части диполей энергия, необходимая для переориентации оставшихся диполей, уменьшается тем значительнее, чем больше число уже переориентированных диполей. Можно представить себе, что в исходном состоянии диполи «мешают» друг другу изменить ориентацию под действием поля, а переориентированные диполи уже «не путаются под ногами» у оставшихся. В результате такого рода кооперативного эффекта проводимость канала очень быстро «лавинообразно» нарастает под действием приложенного электрического импульса. Заметим, что и конформационные перестройки в канале, сопровождающиеся поворотом диполей, могут также приводить к скачкообразным изменениям проводимости в одиночном канале. Фактически во всех предложенных моделях речь идет о своего рода фазовых переходах в мембранах, лежащих в основе скачкообразных переходов канала между двумя состояниями.

Распространение нервного импульса вдоль волокна происходит без затухания с постоянной скоростью. Внутренняя часть волокна на участке возникновения спайка заряжена положительно, а в соседних покоящихся участках — отрицательно (рис. 16.3). Вследствие этого возникает локальный ток между

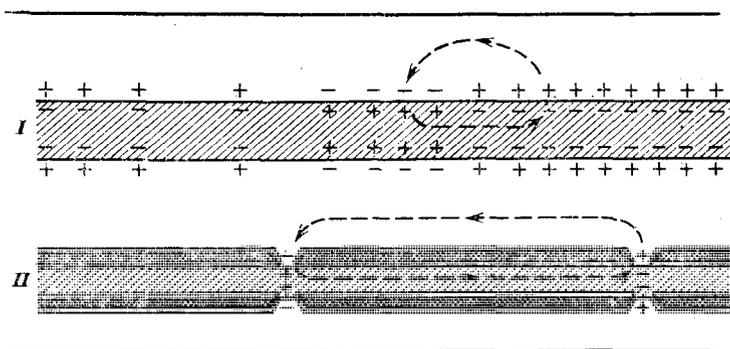


Рис. 16.3. Зарядка поверхности нервного волокна при распространении импульса. (Иллюстрация теории локальных токов по Ходжкин, 1965)

возбужденным и покоящимся участками. Направление его таково, что он деполаризует область мембраны перед активным участком, что также приводит к ее возбуждению и возникновению в ней спайка. Таким образом возбуждение передается дальше

по волокну. Нервное волокно можно уподобить электрическому кабелю, соседние участки которого связаны между собой. Однако в отличие от обычного кабеля распространение нервного импульса сопровождается его затуханием, поскольку в мембране имеются молекулярные «генераторы», подпитывающие бегущий импульс. Нахождение скорости распространения нервного импульса требует исследования кинетики ионных трансмембранных токов (i_{K^+} , i_{Na}), тока утечки, а также знания электрических свойств нервного волокна (емкость и сопротивление). Анализ соответствующих математических моделей показывает, что скорость распространения устойчивого импульса обратно пропорциональна квадратному корню из диаметра волокна, что совпадает с экспериментальными данными. В организме нервные волокна объединены в нервные стволы, где каждое волокно может самостоятельно проводить возбуждение. Электрическое поле, возникающее при этом в возбужденном волокне, влияет на мембранный потенциал соседних волокон, которые тем самым при некоторых условиях могут также возбуждаться.

Лекция 17. ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭНЕРГИИ В ФОТОСИНТЕЗЕ

Последовательность отдельных реакций в фотобиологических процессах включает, как правило, следующие стадии: поглощение кванта света хромофорной группой и образование электронно-возбужденных состояний → миграция энергии электронного возбуждения → первичный фотофизический акт и появление первичных фотопродуктов → образование первичных стабильных химических соединений → физиолого-биохимические процессы → конечный фотобиологический эффект.

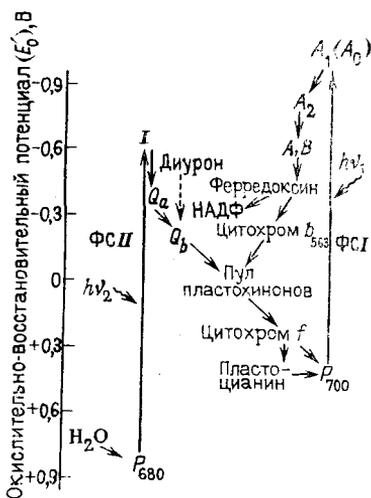


Рис. 17.1. Схема первичных процессов фотосинтеза высших растений. В соответствии с представлениями о последовательном взаимодействии двух фотосистем в так называемой Z — схеме фотосинтеза, восстановленные продукты ФС II служат донорами электронов для ФС I. Возбуждение светом, который в основном поглощается ФС II, должно приводить к восстановлению промежуточных переносчиков в ЭТЦ, а возбуждение ФС I, наоборот, к их окислению

В задачу биофизики входит выяснение механизмов начальных стадий, которые следуют непосредственно за поглощением кванта света. Как мы увидим, несмотря на большое разнообразие фотобиологических эффектов, именно начальные этапы преобразования энергии света характеризуются общими молекулярными механизмами. В основе первичных процессов фотосинтеза лежит сложная совокупность окислительно - восстановительных реакций переноса электрона в электрон-транспортной цепи (ЭТЦ).

Общая схема. На рис. 17.1 приведена общепринятая Z-схема первичных стадий фотосинтеза высших растений, где указаны также времена переноса электрона на отдельных этапах. Как видно, фотосистемы ФС2 и ФС1 функционируют последовательно: донором электронов для ФС1 служат восста-

новленные в результате действия ФС2 фотопродукты. Дальний красный свет ($\lambda > 680$ нм) поглощается преимущественно пигментами ФС1 и вызывает окисление цитохрома, который восстанавливается ФС2 при поглощении коротковолнового света ($\lambda < 680$ нм). Оптимальная интенсивность фотосинтеза наблюдается при определенном соотношении между количеством возбужденных ФС1 и ФС2, которое зависит от спектрального состава света. Поглощение света происходит пигментами светособирающего (СС) пигмент-белкового (ПБ) комплекса (ССПБК), от которого, как из резервуара, энергия возбуждения передается на пигмент-белковые комплексы ФС1 и ФС2 (ПБК1 и ПБК2) и далее непосредственно к реакционным центрам РЦ1 и РЦ2 (рис. 17.2). В зависимости от конформационного состояния фотосинтетических мембран изменяется топография расположения ПБК1 и ПБК2, их связь с ССПБК, и распределение энергии возбуждения между ФС1 и ФС2. Это определяется присутствием ионов в среде, рН среды, степенью фосфорилирования и поверхностным зарядом белков ССПБК. В различных физиологических условиях изменяется роль этих факторов, что таким образом имеет регулирующее значение для распределения энергии возбуждения между фотосистемами. Показателем эффективности дезактивации электронного возбуждения является сокращение длительности возбужденного состояния молекул. Измерения длительности (τ) синглетного возбужденного состояния (S_1) хлорофилла показали, что величина τ в растворе составляет 5 нс, а в хлоропластах она сокращается в 20—30 раз. Очевидно, при попадании возбуждения в РЦ происходит эффективный процесс использования электронной энергии состояния S_1 в первичном акте фотосинтеза. Тем самым время (τ) пребывания хлорофилла в возбужденном состоянии (S_1) в листе сокращается. Тушение флуоресценции разных форм пигментов носит сложный характер. Сокращение времени жизни возбужденного состояния пигментов до 0,5 нс происходит в ССПБК, передающем энергию на ПБК1 и ПБК2. Затем уже осуществляется непосредственно более эффективное тушение возбуждения в РЦ1 и РЦ2 за время 0,03—0,05 нс (рис. 17.2). По мере приближения к РЦ1 и РЦ2 поток энергии возбуждения ускоряется. Миграция энергии между отдельными комплексами (ССПБК и ПБК1 и ПБК2) осуществляется по механизмам индуктивного резонанса, а в пределах одного комплекса она носит экситонный характер.

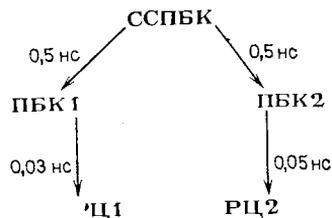
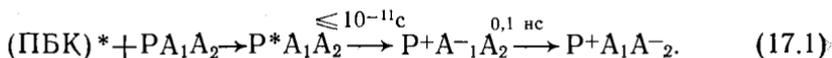


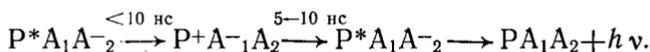
Рис. 17.2. Схема миграции энергии в фотосинтетическом аппарате высших растений

Основной принцип работы РЦ заключается в том, что при попадании возбуждения от (ПБК) в фотоактивный пигмент

(Р) самого РЦ происходят отрыв электрона и восстановление первичного акцептора (A_1), который затем передает электрон следующему акцептору (A_2) и так далее по ЭТЦ:

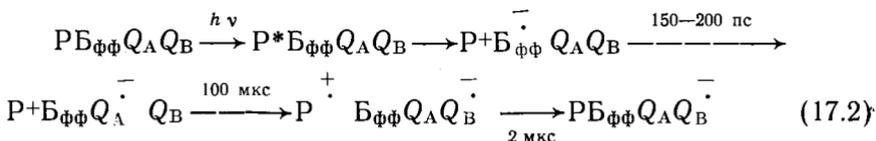


Восстановление Р^+ происходит затем от доноров электрона в ЭТЦ. В качестве A_1 в РЦ выступают производные порфириновых молекул (например, феофитин в РЦ2), а роль вторичного акцептора выполняют молекулы хинона (РЦ пурпурных бактерий), пластохинона (РС2) или железосерные белки (РЦ1). Эффективность отрыва электрона от Р^+ и переноса его на A_1 достигает 95—98% и происходит за времена несколько пикосекунд ($1 \text{ пс} = 10^{-12} \text{ с}$). Заметим, что если в РЦ исходно в темноте вторичный акцептор химически восстановлен, то после появления электрона на A_1 происходят его рекомбинация с Р^+ за 5—10 нс и появление Р^+ . Это сопровождается замедленным свечением

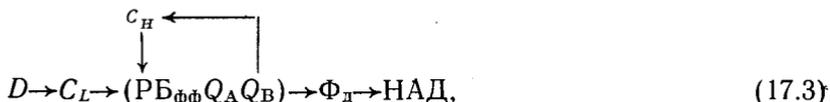


В РЦ пурпурных бактерий была расшифрована кинетика переноса электрона между Р (димер бактериохлорофилла), A_1 (бактериофеофитин БФФ), A_2 (первичный хинон Q_A), A_3 (вторичный хинон Q_B).

Схема переноса имеет вид



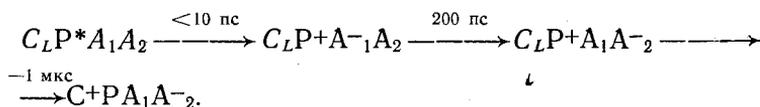
В этих опытах возбуждение осуществлялось короткой лазерной вспышкой (1—2 пс), что позволило изучить кинетику последующих, более медленных стадий переноса электрона. Общая схема первичных процессов бактериального типа имеет вид



где внешним источником электронов для восстановления НАД служит сероводород, органические молекулы. Цитохром C_H обеспечивает циклический поток электронов, а цитохром C_L — связь циклического переноса с внешними донорами электронов.

Физические механизмы. Важнейшая особенность функционирования РЦ состоит в том, что отдельные стадии переноса электрона могут протекать эффективно и при низких температурах, вплоть до температур жидкого азота и жидкого гелия. На рис. 10.5 была приведена типичная двухфазная кривая тем-

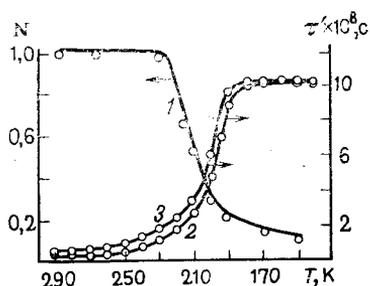
пературной зависимости фотоокисления «нециклического» цитохрома C_L фотоактивным пигментом Р и РЦ пурпурных бактерий. Реакция идет по схеме



Очевидно, туннельный механизм и обеспечивает протекание реакции окисления C_L при низкой температуре.

Как уже говорилось (см. лекцию 10), начальная часть кривой на рис. 10.6 указывает на температурно зависимые активационные процессы возбуждения ядер и переход их на высшие колебательные уровни, с которых уже происходит туннелирование донорно-акцепторного комплекса в конечном состоянии. Вместе с тем сам по себе процесс туннелирования требует предварительного формирования контактного состояния между донорной и акцепторной группами. Это обеспечивается вследствие внутримолекулярной подвижности белка РЦ, где расположены протестические группы переносчиков. Тогда свой вклад в температурную зависимость переноса электрона будет давать и процесс образования контактных состояний. Температурная зависимость транспорта электрона должна коррелировать с внутримолекулярной подвижностью белка РЦ, что и наблюдается в экспериментах. На рис. 17.3 показаны температурные зависимо-

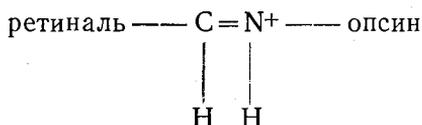
Рис. 17.3. Функциональная активность (1) и конформационная динамика (2, 3) реакционных центров в спин-меченых хроматофорах *R. rubrum* в зависимости от температуры: N — эффективность фотондуцированного переноса электрона от Q_A на Q_B (кривые 1); τ' — эффективный параметр времени корреляции вращательной диффузии гидрофобного спинового зонда (2) и спиновой метки на SH — группы (3)



сти прямого переноса электрона между первичным и вторичным хинонами, а также характерного времени τ' подвижности спиновой метки, присоединенной к белку РЦ. Видно, что при повышении температуры образцов от 140—180° К происходит резкое уменьшение τ' , что говорит о «размораживании» внутримолекулярных движений в белке РЦ. Как раз в том же температурном диапазоне увеличивается и функциональная активность РЦ, приводящая к переносу электрона на вторичный хинон. Аналогичная корреляция наблюдается и в опытах, где измеряется вероятность поглощения γ -кванта без отдачи (см. рис. 9.5). Размораживание белковой макромолекулы сопровождается ее

внутримолекулярными движениями по конформационным под-состояниям (см. рис. 10.1) с амплитудами $\sim 0,3 \text{ \AA}$. При обезвоживании РЦ одновременно падает эффективность переноса электрона и замедляется внутримолекулярная подвижность белка. Роль образования контактных состояний в системе хинонных акцепторов можно упрощенно иллюстрировать следующим образом. Первичный хинон, получив в РЦ электрон, изменяет характер своего движения и переходит на другую конформационную координату, соответствующую его восстановленному состоянию (см. рис. 11.8). Здесь он, достигнув определенного контактного состояния со вторичным хиноном, отдает ему электрон. При низких температурах подвижность первичного хинона падает, а следовательно, уменьшается и эффективность переноса электрона от него на вторичный хинон. Если, однако, образец медленно охлаждать в условиях постоянного интенсивного освещения, когда в результате действия света и отрыва электрона от Р молекулы первичного хинона в основном находятся в восстановленном состоянии, то картина существенно изменяется. В этих условиях, как показали опыты, восстановленный на свету первичный хинон уже исходно успевает перейти в контактное состояние, в котором перенос электрона от него на вторичный хинон по туннельному механизму происходит быстро и при низких температурах. Поэтому в таких образцах, охлажденных до низких температур на непрерывном свете, эффективность переноса электрона от температуры практически уже не зависит. Очевидно, туннелирование происходит здесь эффективно с низких колебательных уровней и с быстрой диссипацией части энергии по акцептирующей моде при низких температурах. Таким образом, можно ожидать, что в исходно «приготовленных» контактных состояниях между переносчиками температурная зависимость собственно переноса электрона может быть слабо выражена. Действительно, первичный акт восстановления БФФ в РЦ центрах пурпурных бактерий, происходящий за $\tau \leq 10 \text{ пс}$ ($\text{P}^* \text{ БФФ} \rightarrow \text{P}^+ \text{ БФФ}^-$), от температуры практически не зависит до -196° . В другом важном случае изучалась температурная зависимость окисления цитохрома С, участвующего в циклическом потоке в РЦ пурпурных бактерий (17.3). В отличие от «нециклического» цитохрома С (рис. 10.5) скорость окисления C_H ($\text{C}_\text{H}\text{P}^+ \rightarrow \text{C}^+\text{H}\text{P}$) практически от температуры не зависит. Однако при температурах ниже некоторой критической происходит уменьшение числа молекул цитохрома С, подвергающихся фотоокислению, вследствие падения количества контактных состояний ($\text{C}_\text{H}\text{P}$). У оставшихся активными молекул C_H константа скорости окисления остается практически неизменной. Распад контактных состояний ($\text{C}_\text{H}\text{P}$) происходит не только с понижением температуры, но и при дегидратации белка РЦ. Роль воды и температуры проявляется как в обеспечении подвижности, так и стабилизации образованных контактов между донорно-акцепторными группами.

В последнее время получены интересные результаты о молекулярных механизмах фотопревращений зрительного пигмента родопсина и родственного ему бактериородопсина (БР), обнаруженного в пурпурной мембране галофильных бактерий. Каждая молекула БР содержит один хромофор-ретиаль (полиеновый альдегид) в комплексе с белком-опсином



Энергия света, поглощенная ретиалем, используется для активного переноса протона через мембрану, создания электрохимического градиента водорода и синтеза АТФ. Начальный этап трансформации энергии света протекает за время < 10 пс. Он включает транс-, цисизомеризацию ретиаля, сдвиг протона Шиффа основания и структурно-поляризационные изменения ближайшего белкового окружения ретиаля (рис. 17.4). Это

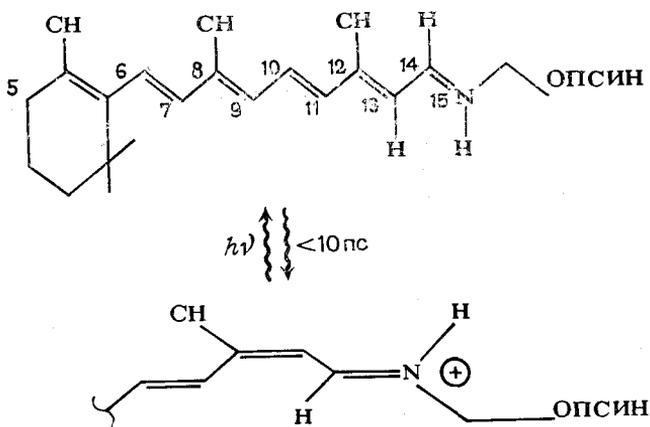


Рис. 17.4. Схема первичного акта фотоцикла бактериородопсина

дает начало каскаду последовательных конформационных перестроек в макромолекулярном комплексе ретиаль—опсин, приводящих в итоге к транслокации протона через мембрану, возможно, по сетке водородных связей. В случае родопсина хромофором также служит ретиаль, соединенный с опсином Шиффовым основанием. В исходном состоянии ретиаль находится в 11-циссостоянии. Начальный акт фотопревращений родопсина включает цис-, трансизомеризацию ретиаля, сопряженную со смещением протона Шиффа основания. В обоих случаях на-

чальная стадия фотоизомеризации ретиналя в комплексе с опсином происходит намного скорее (за пикосекунды), чем у свободного ретиналя в растворе (несколько наносекунд). В этом состоит роль специфического белкового окружения ретиналя, которое не только обеспечивает его быструю изомеризацию, но и создает условия для стабилизации образованных промежуточных конформационных состояний в их последующих направленных изменениях. Конечным результатом фотопревращений родопсина является возникновение зрительного электрического сигнала в рецепторной мембране сетчатки глаза. В процессе формирования рецепторного ответа зрительной клетки принимают активное участие ферментативные системы.

Мы видим, что первичные стадии трансформации энергии света в фотоэнергетических и фотоинформационных процессах протекают с участием белкового окружения хромофора. Они осуществляются согласно принципу фотоиндуцированных электронно-конформационных взаимодействий, которые носят направленный характер, соответствующий специфическим структурным особенностям фоточувствительного хромопротеида.

Лекция 18. ТРАНСФОРМАЦИЯ ЭНЕРГИИ В БИОМЕМБРАНАХ

Одна из важнейших функций биологических мембран состоит в обеспечении трансформации энергии, сопряженной с преобразованием ее из одного вида в другой. Это, собственно, и составляет основу биоэнергетических процессов в клетке. Как известно, энергия, необходимая для различных видов жизнедеятельности клетки, утилизируется в виде энергии химических связей молекулы АТФ, синтез которой в живой природе осуществляется главным образом в биологических мембранах митохондрий и хлоропластов (хроматофоров). Во всех этих системах движущей силой является электронный поток, который генерируется в митохондриях за счет окисления субстрата и в хлоропластах — за счет энергии света. Здесь перенос электрона сопряжен с транслокацией протонов и синтезом АТФ в АТФ-синтезе.

Возможны различные механизмы переноса протона через мембрану при транспорте электрона по цепи переносчиков, которые асимметрично расположены в мембране. Возможно образование в белковой части переносчика протонного канала, проводимость которого зависит от окислительно-восстановительного состояния самого переносчика. Таким образом, переносчик

электронов одновременно выполняет функции протонного насоса. Перенос протона может происходить и в результате работы подвижных переносчиков, которые диффундируют через мембрану от одной ее стороны на другую. Они восстанавливаются в ЭТЦ на одной стороне мембраны и одновременно с электроном присоединяют протон, затем, диффундируя на другую сторону мембраны, окисляются и выбрасывают протон в примембранную область. Именно так осуществляются эти функции в мембранах тилакоида в хлоропластах, где таким образом он передает электроны и протоны с наружной (отрицательной) к внутренней (положительной) поверхности. Отметим, что в митохондриях полярность мембраны обратна полярности тилакоида (плюс на наружной, минус на внутренней стороне). В тилакоиде протоны потребляются из наружной фазы и переносятся во внутреннюю, которая таким образом подкисляется при работе ЭТЦ. Это приводит к появлению трансмембранного градиента концентрации протонов (ΔpH) между наружной и внутренней фазами тилакоида. Одновременно создается и трансмембранная разность электрических потенциалов ($\Delta\phi$) за счет увеличения положительного заряда внутри тилакоида при накоплении там положительно заряженных протонов. Свой вклад в разность электрических потенциалов на мембране вносит и собственно фотохимический перенос электрона на наружную сторону при работе фотосистем ФС I и ФС II. Образующееся таким образом электрическое поле ($\Delta\phi$) влияет в свою очередь на перенос других проникающих через мембрану ионов, которые в свою очередь изменяют $\Delta\phi$ и влияют на перенос протонов. В результате наблюдается сложная картина взаимного влияния двух составляющих ΔpH и $\Delta\phi$ трансмембранного электрохимического потенциала. В стационарных условиях величина электрохимического градиента на мембране будет зависеть от соотношения скоростей трансмембранного переноса электрогенных ионов, транслокации протонов и потока электронов по ЭТЦ.

Хемиосмотический принцип сопряжения Митчелла предполагает, что перенос электронов связан с синтезом АТФ именно через образование этой трансмембранной разности электрохимических потенциалов ионов водорода

$$\Delta\bar{\mu}_{H^+} = F \Delta\phi + 2,3 RT \Delta pH,$$

где F — число Фарадея.

Энергия $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ используется для синтеза АТФ в специальном ферменте — мембранной АТФ-синтетазе. Надо ясно понимать, что сама по себе величина электрохимического потенциала характеризует термодинамическую движущую силу синтеза АТФ, но ничего не говорит о молекулярных механизмах этого процесса.

АТФазный комплекс включает растворимую АТФазу (фактор F_1), где происходит синтез АТФ, и мембранную часть (фак-

тор F_0), где формируется протонный канал. По этому каналу протоны поступают в гидрофобную область к активному центру, а затем оттуда в воду по другую сторону мембраны. Конкретный механизм переноса протонов до конца неясен, но, вероятно, он представляет собой эстафетную передачу протона по донорно-акцепторным группам аминокислот (арг, тир, глут). Фактор F_1 является полуфункциональным белком, включает несколько субъединиц и обладает сложной четвертичной структурой. Работа АТФазы сопровождается кооперативными конформационными перестройками, затрагивающими четвертичную структуру. Каким же образом энергия $\Delta\mu_{H^+}$ может использоваться в этом макромолекулярном устройстве для синтеза АТФ? Прежде всего отметим, что величина $\Delta\mu_{H^+}$ определяет лишь вероятность или среднее число переноса протонов между поверхностями мембраны, но ничего не говорит о «судьбе» каждого протона в АТФазе. В одном из вариантов хемиосматической гипотезы говорилось о том, что в активный центр АТФазы нагнетаются «горячие» протоны, которые разгоняются электрическим полем в протонном канале. Предполагалось, что за счет кинетической энергии этих протонов и происходит передача энергии, нужной для преодоления активационного барьера в элементарном акте синтеза АТФ. Однако в конденсированной белково-липидной фазе, где диссипация избыточной кинетической энергии «горячих» частиц в результате столкновений происходит быстро (10^{-11} — 10^{-12} с), такой механизм невозможен (см. лекции, 8-9). По-видимому, в решении этой проблемы следует отказаться от упрощенных физико-химических подходов, заимствованных из теории активных соударений свободных частиц в растворах. В лекции 12 мы подробно рассматривали современные биофизические теории механизмов ферментативного катализа.

В последние годы появились биохимические результаты, подтверждающие плодотворность такого подхода и к проблеме механизмов сопряжения в H^+ -АТФазе. Протонирование и депротонирование аминокислотных остатков в центрах приводят к образованию локальных электрических полей, которые в свою очередь также влияют на движение положительно заряженного комплекса АТФ с лигандами. Таким образом, узким местом является перенос исходных веществ и промежуточных и конечных продуктов реакции синтеза АТФ, что обеспечивается и за счет влияния компонентов электрохимического потенциала на процессы внутримолекулярной диффузии в фермент-субстратном комплексе H^+ -АТФазы. Конечно, все стадии требуют строгой координации во времени и пространстве и сбалансированности по зарядам этих процессов, что отражает направленный кооперативный характер функционирования H^+ -АТФазы в сопрягающих мембранах.