

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное агентство по образованию
Московский физико-технический институт
(государственный университет)

Э.М. Трухан

ВВЕДЕНИЕ В БИОФИЗИКУ

Рекомендовано

Учебно-методическим объединением

*высших учебных заведений Российской Федерации
по образованию в области прикладных математики и физики
в качестве учебного пособия*

МОСКВА 2008

УДК 577.3
ББК я73
Т77

Рецензенты:

Кафедра биомедицинских технологий Московского Государственного Технического Университета им. Н.Э. Баумана

Доктор физико-математических наук А.И. Дьяченко.

Трухан Э.М.

Т77 Введение в биофизику: Учебное пособие. – М.: МФТИ, 2008.
– 000 с.
ISBN 5-7417-0240-6

В настоящем учебном пособии рассматриваются физические механизмы преобразования энергии, информации и вещества в живых организмах на молекулярно-клеточном и системном уровнях. Теоретические положения иллюстрируются конкретными примерами. Пособие является кратким введением в обширный предмет современной биофизической науки перед более глубоким изучением отдельных его разделов в процессе дальнейшей научной специализации.

Пособие предназначено для студентов бакалавриата, специализирующихся или имеющих интересы в области наук о жизни, и рассчитано на читателей, имеющих подготовку по общей физике в объеме вузов физического профиля.

УДК 577.3
ББК я73

ISBN 5-7417-0240-6

© Трухан Э.М., 2008
© Московский физико-технический институт
(государственный университет), 2008

Оглавление

1. Что такое биофизика.	5
2. Живой организм как физическая система	8
2.1. Термодинамика живого объекта	8
2.1.1. Термодинамические системы	9
2.2. Формализм химической термодинамики	21
2.3. Элементы линейной неравновесной термодинамики	28
2.4. Стационарное состояние неравновесной системы	31
2.4.1. Теорема Пригожина	31
2.4.2. Поведение в окрестности стационарного состояния	34
3. Основы биоэнергетики.	43
3.1. Природные источники свободной энергии	42
3.2. АТФ и макроэргическая фосфатная связь	46
3.3. Источники энергии для образования АТФ в клетке	51
3.4. Окислительно-восстановительный потенциал.	58
3.5. Механизм сопряжения окисления и фосфорилирования	65
3.6. Энергетическая система живой клетки	78
4. Биофизика фотосинтеза.	84
4.1. Элементы физиологии фотосинтеза.	84
4.2. Квантовая биофизика фотосинтеза	86
5. Энергетика частных процессов в живых системах	108
5.1. Перенос вещества	108
5.1.1 Пассивный транспорт	109
5.1.1.1 <i>Диффузия электронейтральных частиц</i>	109
5.1.1.2. <i>Пассивный транспорт заряженных частиц</i>	116
5.1.2. Активный транспорт	123
5.1.2.1. <i>Натрий-калиевый насос</i>	125
5.1.2.2. <i>Кальциевый насос</i>	131
5.1.3. Осмотические явления	135
5.1.3.1. <i>Осмотическое давление</i>	135
5.1.3.2. <i>Трансмембранные осмотические потоки</i>	137
5.2. Биологическая подвижность. Механохимия	140
5.2.1. Внутриклеточная механохимия	140
5.2.2. Мышечное сокращение	147

5.2.2.1. <i>Строение поперечно полосатых мышц</i>	147
5.2.2.2. <i>Элементарный акт сокращения</i>	150
5.2.2.3. <i>Режимы работы целой мышцы</i>	154
5.3. Биотоки и биопотенциалы	160
5.3.1. Общие соображения	160
5.3.2. Потенциал покоя живой клетки	165
5.3.3. Потенциал действия	168
5.3.4. Распространение нервного импульса	174
5.3.5. Межклеточный перенос потенциала действия	178
5.4. Биорецепция адекватных воздействий.	183
5.4.1. Принципы организации клеточных рецепторов.	184
5.4.2. Хеморецепция.	192
5.4.3. Фоторецепция.	196
5.4.4. Слуховая рецепция.	209
5.5. Элементы радиационной биофизики.	230
5.5.1. Основные характеристики излучения и его биологической активности.	221
5.5.2. Естественные источники радиации	225
5.5.3. Первичные реакции поражения живой ткани	227
5.5.3.1. <i>Радиолиз воды</i>	228
5.5.3.2. <i>Радиолиз органических молекул.</i>	230
5.5.4 . Элементы теории мишеней.	232
6. Заключение.	236
Сисок рекомендуемой литературы.	259

1. Что такое биофизика

Уважаемый читатель! Учебное пособие, которое Вы раскрыли, предназначено для тех, кто, получая образование физика, уже одолел общую физику и стал перед вопросом: какой области обширной физической науки отдать в дальнейшем свои силы как исследователя? С таким вопросом сталкиваются многие молодые естествоиспытатели, выбравшие физику в качестве своего основного инструмента познания природы. Много лет назад в таком же положении оказался и автор этих строк. И хотя это было после успешной защиты дипломной работы по интересной и новой в то время проблеме создания квантовых генераторов, идея использования теоретических и экспериментальных методов физики для изучения живой материи оказалась более привлекательной. Тогда не было сегодняшнего обилия учебной литературы по биофизике, и автор руководствовался интуитивными общими соображениями о возможности использования физического подхода к решению задач, связанных с функционированием живой клетки. Посещение научных семинаров и лекций крупных учёных, профессионально работавших в этой области, помогло утвердиться в правильности такого выбора. Но одновременно выяснилось, что для того, чтобы вести самостоятельную творческую работу, а не ограничиваться помощью биологам и медикам в использовании в их работе физикотехнических средств, требуется большой дополнительный объём знаний. И не только в медико-биологической области, но и, как ни странно, в физико-математических науках. Биофизика оказалась не только интересной, но и сложной междисциплинарной областью науки.

В последующие годы, много общаясь со студентами-физиками и обсуждая волнующие их проблемы, я часто вижу себя на их месте и испытываю желание поделиться своим опытом. Интересующимся физическими проблемами биологии и медицины необходимо помочь

правильно оценить содержание и возможности физических методов в этой области, предостеречь их от упрощённого представления о роли физики в изучении живой материи и убедить их в необходимости дополнительного изучения тех разделов теоретической и экспериментальной физики, которые слабо отражены в традиционных учебных курсах, но необходимы на современном этапе развития биофизики. Тем же, кто ещё не определился со своими профессиональными интересами, полезно показать привлекательность физики живого, увлечь их загадками процессов, происходящих в них самих, соблазнить их престижной задачей получить на кончике пера или микроэлектрода решение актуальных задач функционирования живой материи. Наконец, независимо от выбираемой области научной деятельности, молодым специалистам полезно подсмотреть, *как* живая природа в весьма ограниченных физико-химических условиях находит простые, но эффективные решения в преобразовании энергии, вещества и информации. Многие из этих решений могут стать источником идей для инноваций в других областях науки и технологий.

Возвращаясь к существу содержания первого раздела, следует уточнить понятия *биофизики*. Существует несколько определений биофизики. Вот какое определение даётся в известном учебнике М.В. Волькенштейна (1981 г.): «Биофизика – физика явлений жизни, изучаемых на всех уровнях, начиная с молекул и клеток и кончая биосферой в целом». В «Методических указаниях по биофизике» А.Б. Рубина и О.Р. Кольс (1984 г.) видим другое определение: «Биофизика – наука о наиболее простых и фундаментальных механизмах взаимодействий, лежащих в основе биологических явлений». В сущности, между ними нет противоречия, и они оба успешно противостоят шутливому определению того же М.В. Волькенштейна (1982 г.): «Биофизика – это работа врача с прибором, устройство которого слишком сложно для его понимания».

Однако, можно дать более общее определение. Обратившись к лингвистическим корням понятия *физика* (по гречески *physiké* – природа), вспомним, что физика это – наука о природе. Но тогда логично признать, что *биофизика это физика живой природы*.

Итак, биофизика использует физический метод исследования своего объекта. А в чём сущность физического подхода? По мнению автора, это подход, при котором сложный реальный объект подменяется его упрощённой моделью, сохраняющей лишь главные черты объекта и оставляющей на время в стороне его второстепенные характеристики. Такой подход позволяет выразить ожидаемые свойства объекта в лаконичной математической форме и сверить их с экспериментально

наблюдаемыми количественными характеристиками объекта. Если в пределах точности они совпадают, то возникает ощущение, что свойства объекта познаны. Однако с повышением точности эксперимента неизбежно возникает расхождение ожидаемых и наблюдаемых характеристик, и тогда модель уточняется включением дополнительных свойств, которые ранее считались несущественными. Этот процесс смены моделей объекта продолжается вечно. Ретроспективный взгляд на историю развития физики и формирование её основных понятий убедительно подтверждает справедливость таких представлений о сущности физического подхода.

Однако далеко не всегда для построения адекватной модели достаточно интуиции. Для выделения главных и второстепенных характеристик объекта обычно требуются их количественные оценки. А для этого необходимо достаточное развитие и биологии, и физики. В биологии должен сформироваться определённый понятийный аппарат, в физике – методы теоретической оценки или экспериментального определения соответствующих величин. Поэтому биофизика как физическая наука смогла появиться лишь при достаточной степени развития естественных наук. И хотя отдельные биофизические работы появились ещё в средние века в трудах Л. Эйлера и Д. Бернулли и практически все великие учёные в своё время вносили свой вклад в биофизику, бурное развитие биофизической науки закономерно пришлось на XX столетие. А реальная востребованность биофизики отчётливо проявляется в настоящее время.

Здесь уместно поставить важный вопрос: является ли биофизика самостоятельной наукой и, если нет, то чем она отличается от других разделов физики, таких, как гидродинамика, физика твёрдого тела, атомная физика и т.п.? Первый вопрос можно перефразировать: достаточно ли возможностей современной физики, чтобы понять закономерности процессов в живых системах или в процессе познания могут возникнуть новые фундаментальные понятия, не известные *обычной* физике? Аналогичный вопрос возникал в своё время по отношению к химии: можно ли свести химию к физике. Ответ на этот вопрос в остроумной формулировке Л.А. Блюменфельда (1974 г.) звучит вполне определённо: «Можно, но не нужно!». В отношении биофизики ситуация сложнее. Современный уровень развития естествознания не позволяет однозначно ответить на этот вопрос. Любой ответ на него опирается больше на веру, чем на знания. И если сегодня складывается впечатление, что *обычной* физики достаточно, то, что будет дальше, покажет лишь время. Ответ на второй вопрос проще: даже если биофизика не является самостоятельной наукой, то она не явля-

ется простой частью физики, она охватывает все её разделы и побуждает к жизни новые. Достаточно назвать теорию систем, синергетику, физику необратимых процессов, неньютоновскую гидродинамику, туннельный перенос в конденсированных средах, многочисленные специальные экспериментальные методы исследования. Уместно напомнить, что фундаментальный физический закон сохранения энергии был впервые сформулирован врачом Ю.Р. Майером (1842 г.) как обобщение наблюдений над живым объектом.

Биофизика – наука молодая, но в ней уже произошла своя структуризация. Сегодня она делится по двум ортогональным признакам: по объектам исследования (молекулы, клетки и сложные системы) и по методам исследований (экспериментальный, теоретический и математический). Девять элементов этой матрицы и создают сегодняшнюю структуру биофизической науки – от математической физики сложных систем до экспериментальной молекулярной биофизики.

2. Живой организм как физическая система.

Примем как факт, что живой организм существует, яростно борется за свое существование и развитие и без видимого сопротивления после этого умирает. Не задаваясь сложным (и не лишённым смысла!) вопросом – зачем это нужно? – остановимся лишь на физических аспектах его существования. Посмотрим на отличие живого объекта от неживой системы с точки зрения физики и начнем с термодинамического аспекта.

2.1. Термодинамика живого объекта.

В тезисной форме особенности живого организма можно выразить следующим образом.

Живой организм – это гетерогенная неравновесная система открытого типа, способная к самоорганизации, саморегуляции и имовоспроизведению. Она возникает в результате необратимого индивидуального и эволюционного развития за счет потребления свободной энергии из окружающей среды. Её гибель и распад сопровождаются установлением термодинамического равновесия внутри системы и с окружающей средой.

Это развернутое определение раскрывает в физических терминах известное определение жизни по Ф. Энгельсу¹ и подчеркивает физиологические особенности живого организма. Чтобы оценить эти особенности, вспомним необходимые определения и понятия термодинамики.

2.1.1. Термодинамические системы.

1. *Изолированная*: независимая система, которая не взаимодействует с окружающей средой.
2. *Замкнутая (закрытая)*: система, которая не обменивается веществом с окружающей средой.
3. *Открытая*: может обмениваться со средой энергией и веществом.

Тепловое (термодинамическое) равновесие изолированной системы – это состояние, в котором она может пребывать как угодно долго. Это конечное состояние для любой изолированной системы независимо от её начального состояния.

Термодинамическое состояние в узком смысле – это тепловое равновесие. В широком смысле – это состояние системы, при котором её части находятся каждое в своем тепловом равновесии (*локальные равновесия*).

Классическая термодинамика изучает свойства систем в состоянии теплового *равновесия*. Строго говоря, она не занимается *переходами* между различными состояниями и в этом смысле является не термодинамикой, а *термостатикой!* Время вообще в классическую термодинамику в явном виде не входит! Фактически переход между состояниями – это процесс, идущий во времени с конечной скоростью. Классическая термодинамика, говоря о переходах, имеет в виду идеализацию – *равновесный процесс*, т.е. процесс, идущий с *нулевой скоростью* без заметного отклонения от равновесия, т.е. *обратимо*.

Обратимый процесс – это такой процесс, который может быть обращен так, что: 1) переменные, характеризующие состояние систем, проходят тот же ряд значений, но в обратном порядке; 2) обмен системы со средой при этом имеет обратный знак.

¹ «Жизнь – это способ существования белковых тел, существенным моментом которого является постоянный обмен веществ с окружающей их внешней природой». Ф. Энгельс

Все процессы, не удовлетворяющие обоим признакам называются *необратимыми*.

Обратимые процессы, формально говоря, характеризуются инвариантностью своих уравнений к замене $t \rightarrow -t$. Например, волновое уравнение –

$$\partial A^2 / \partial t^2 = k \Delta A$$

или динамическое уравнение в консервативной системе:

$$m d^2 r / dt^2 = F(r)$$

описывают обратимые процессы. Уравнение же переноса или движение с трением

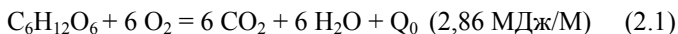
$$\partial A / \partial t = k \Delta A, \quad m d^2 r / dt^2 = F(r) - k dr / dt$$

относятся к необратимым процессам. Ясно, что обратимость является идеализацией, т. к., вообще говоря, диссипация энергии всегда существует. Для изучения процессов, идущих с конечной скоростью, нужно развивать *неравновесную термодинамику*.

Теперь, возвращаясь к особенностям живой системы, мы видим, что она представляет собой объект диаметрально противоположный обычным объектам классической термодинамики: это – *неравновесная открытая система с необратимыми процессами*.

Эти особенности иногда служат поводом для недоразумений относительно применимости законов термодинамики к живым системам.

Действительно, в основе энергетики живых систем лежит экзотермическая реакция окисления глюкозы:



(Q_0 – определяется в калориметре с использованием закона Гесса). Часть выделенной в организме энергии используется для совершения полезной работы. КПД её преобразования в *тепловом цикле* лимитируется теоремой Карно:

$$\eta \leq (T_1 - T_2) / T_1 \quad (2.2)$$

где T_1 – температура нагревателя, T_2 – температура холодильника в абсолютной шкале. Перепад температуры в организме не превышает 1°C . Следовательно, $\eta \leq 1/300 = 0,3 \%$. А фактически измеренный η для мышечного аппарата $\approx 50 \%$! Вот первое проявление разрыва между развитым аппаратом классической термодинамики и потребностью физики живых систем. Однако отсюда нельзя сделать вывод о нарушении законов термодинамики. Единственно правильный вывод – значит живой организм работает *не по принципу тепловой машины*. Соотношение (2.2) остается справедливым, но не уместным: η в данном случае лимитируется другими соотношениями. Всякий же переход свободной энергии реакции (2.1) в тепло – это безвозвратная потеря свободной энергии, ибо обратное преобразование тепловой энергии в работу действительно лимитируется очень жесткими условиями (2.2).

Впрочем, здесь уместно задать один важный вопрос: а что вообще может дать термодинамический подход для физики живых систем, кроме разъяснения тривиальных недоразумений, вроде данного?

Ответить на этот вопрос совсем не просто. С одной стороны, живая система, в отличие от неживых машин и механизмов, состоит не из твердых, а из *мягких* частей, в значительной части из жидкости, т.е. из большого числа слабо связанных частиц, и имеет огромное число внутренних степеней свободы. Описать поведение такой системы методами динамики, решая уравнения движения для огромного числа частиц N , практически невозможно. Но именно в этом случае поведение системы должно хорошо описываться средними величинами (флуктуации $\sim 1/\sqrt{N} \rightarrow 0$) и являться объектом термодинамики. А термодинамика оперирует макроскопическими величинами (P, T, U, S, \dots) и, не прибегая к умозрительным предположениям о микроскопических характеристиках, т.е. к молекулярным моделям процессов, позволяет получить общие соотношения, исходя из самых простых фундаментальных законов природы. Т.е., казалось бы, термодинамика является как раз вполне подходящим аппаратом для описания такой сложной системы, как живая. Правда, с учетом уже сделанных оговорок об открытости и неравновесности системы. Но дело не только в этом. Есть другая – более принципиальная сторона вопроса, которая заключается в том, в какой мере живую систему можно считать статистической, а не динамической. Достаточно ли *большого числа частиц* у мягкого тела, чтобы считать, что молекулярные или атомные движения стохастизуются, энергия быстро расплывается по всем степеням свободы, а фазовые траектории системы размазываются равномерно

мерно по всему фазовому пространству, давая возможность пользоваться средними по ансамблю вместо средних по времени, что необходимо для термодинамики? Этот фундаментальный вопрос важен не только для биофизики. Он важен для общей физики и, хотя в общих чертах решен, обычно мало освещается в учебных курсах и остается в тени.

Речь идет о проблеме, *когда и как* происходит переход от *системы динамической*, поведение которой однозначно описывается уравнениями динамики с начальными условиями, к *системе статистической*, в которой описание движения отдельных частиц бессмысленно и нужно (и можно!) пользоваться средними величинами, т.е. использовать термодинамические переменные. Предельные случаи ясны: при $N \rightarrow 0$ - динамика и причинность, при $N \rightarrow \infty$ - статистика и хаос. Эти описания оперируют *разными* параметрами. Но где и почему происходит переход? Данная проблема волновала многие великие умы. Много сил отдал ей Л. Больцман (1844–1906). Именно он задался целью изучить *эволюцию* механической системы в статистическую и пытался проследить с помощью механики за возникновением необратимости и возрастанием энтропии в системе. Эту проблему он решал в своей «Н-теореме» (1872), но не достиг успеха. Затем этой проблемой занимался П. Эренфест (1880–1933), но тоже потерпел неудачу. Уже в XX веке пути решения проблемы были найдены в работах Н.С. Крылова (1947) и развиты далее в работах Н.Н. Боголюбова, А.Я. Хинчина, Г.Я. Синая, А.Н. Колмогорова.

Идея Н.С. Крылова заслуживает внимания и в несколько упрощённом виде заключается в следующем. Пусть имеется множество одинаковых шаров радиуса R , движущихся в некоторой горизонтальной ограниченной плоскости как шары на бильярдном столе (или шайбы на хоккейной площадке). Пусть трение отсутствует, а все столкновения шаров между собой и с бортами упругие. Можно ли найти траектории шаров или одного выделенного шара в любой момент времени, если заданы начальные положения и скорости всех шаров? Ответ кажется очевидным: в рамках заданных условий задача отыскания $r = f(t)$ вполне решаемая, правда, с ростом числа шаров будут заметно возрастать технические сложности вычислений. Но все же можно предсказать траекторию шара в любой как угодно большой интервал времени. Посмотрим, однако, какое отношение будет иметь полученное решение к реальной ситуации. Иначе говоря, насколько устойчиво полученное решение к малейшим изменениям (возмущениям) скоростей отдельных шаров в начальный момент времени, которые всегда имеют место в реальной системе (рис. 2.1).

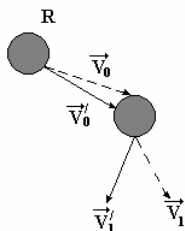


Рис. 2.1. Схема возмущения начальной скорости шара

Рассмотрим элементарный акт: столкновение двух шаров. Решение задачи определения скоростей значительно ускорится, если перейти в систему координат, движущейся вместе с одним из шаров, представив его как неподвижный с радиусом $2R$, а налетающий на него шар как точку с нулевым радиусом и соответствующей скоростью. При таком описании связь между направлениями начальной и конечной скоростей и их возмущениями легко установить (рис. 2.2).

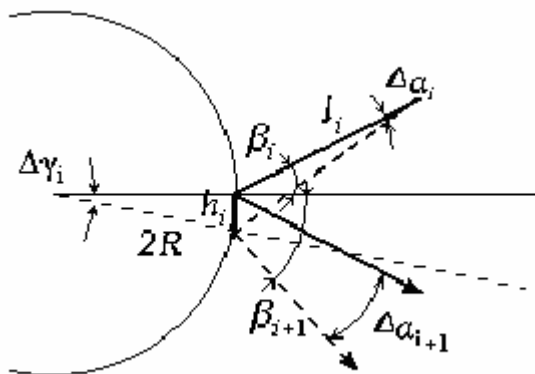


Рис. 2.2. Математическая модель упругого столкновения шаров

Пусть после предыдущего i -го столкновения направление скорости налетающего шара характеризуется углом β_i по отношению к нормали в точке падения. Если возмущение заключается в малом изменении β_i на величину $\Delta\alpha_i$, то возмущение угла отражения помимо $\Delta\alpha_i$ должно включать и величину, обусловленную смещением точки падения на величину, h_i и соответствующим поворотам новой нормали в точке падения:

$$\beta_{i+1} - \beta_i = \Delta\alpha_i + \Delta\gamma_i \quad (2.3)$$

Здесь индекс $i+1$ относится к параметрам движения после $i+1$ удара. Из рисунка 2.2 легко определить, что

$$\Delta\gamma_i = h_i/2R, \quad h_i = l_i \Delta\alpha_i / \cos \beta_i \quad (2.4)$$

При этом возмущение направления траектории после удара:

$$\Delta\alpha_{i+1} = \beta_{i+1} - \beta_i + \Delta\gamma_i \quad (2.5)$$

Используя (2.4), получим:

$$\Delta\alpha_{i+1} = \Delta\alpha_i Q_i, \quad (2.6)$$

где

$$Q_i = 1 + l_i/R \cos \beta_i \quad (2.7)$$

Рассматривая последнюю формулу как рекуррентную, легко получить выражение для возмущения траектории после N последовательных столкновений шара:

$$\Delta\alpha_N = \Delta\alpha_{N-1} Q_{N-1} = \Delta\alpha_{N-2} Q_{N-2} Q_{N-1} = \Delta\alpha_0 (\prod Q_i)_{i=0 \dots N} \quad (2.8)$$

Введя среднюю частоту столкновений ν , можно придать формуле (2.8) более приглядный вид:

$$\Delta\alpha_N = \Delta\alpha_{N-1} e^{[\ln Q] N} = \Delta\alpha_{N-1} e^{[\ln Q] \nu t} \quad (2.9)$$

где $[\ln Q]$ - среднее значение $\ln Q_i$. Формула (2.9) выражает экспоненциальный рост возмущения траектории с числом столкновений, а значит, и со временем. Характерное время этого нарастания

$$\tau = ([\ln Q] \nu)^{-1} \quad (2.10)$$

отражает период времени, через который лавинообразный характер нарастания возмущения становится очевидным. Аналогично

$$N = \tau \nu = [\ln Q]^{-1} \quad (2.11)$$

отражает характерное число столкновений, после которого нарастание возмущения грозит катастрофой. Возмущение действительно можно назвать катастрофой, когда возмущенная траектория пройдет мимо

очередного шара, находящегося на пути невозмущенного движения. При этом очередное столкновение не произойдет, и последующее движение шара уже не будет иметь ничего общего с невозмущенным. Это произойдет тогда, когда

$$h_i = [l_i \Delta \alpha_i / \cos \beta] = \Delta \alpha_0 [l_i / \cos \beta] e^{[\ln Q] vt} \geq R \quad (2.12)$$

Это условие определяет характерный период до катастрофы τ и характерное число соударений до неё N'

$$N' = \nu \tau = \{ \ln \Delta \alpha_0 [l_i / R \cos \beta_i] [\ln Q_i] \}^{-1} = \{ \ln \Delta \alpha_0 [Q_i - 1] [\ln Q_i] \}^{-1} \quad (2.13)$$

Таким образом, N (как и τ) является масштабом, на котором разыгрывается катастрофа, т.е. в механической системе, подчиняющейся законам динамики, возникает хаос, при котором динамическое описание системы теряет законность и возникает необходимость в статистическом описании.

Если уж катастрофы появились, то их число нарастает лавинообразно. Действительно, кинетику их возникновения можно описать простым уравнением. Пусть n_0 – общее число шаров, n – число шаров, уже испытавших катастрофу. Так как каждое столкновение *нормального* шара с *катастрофным* превращает его в *катастрофный*, то скорость образования *катастрофных* шаров из-за этого процесса выглядит так:

$$dn/dt = n(n_0 - n)SN/V \quad (2.14)$$

где S – поперечное сечение шара, u – его скорость, V – объем сосуда.

Решение этого уравнения:

$$n/(n_0 - n) = C e^{\nu t} \quad (2.15)$$

где $\nu = n_0 S U / V$ – частота соударений.

Пока $n \ll n_0$, $n \sim e^{\nu t}$, и хаос возрастает экспоненциально, если наоборот $n \rightarrow n_0$, т.е. $n_0 - n \ll n_0$, то $n - n_0 \sim e^{-\nu t}$, и порядок убывает катастрофически. При этом законность динамического описания системы исчезает, но одновременно нарастает возможность и необходимость её статистического описания. С ростом числа соударений становится все более справедливой эргодическая гипотеза: среднее по ансамблю частица начинает совпадать со средним по времени для любой частицы, т.е. каждая частица за достаточно большое время успевает побывать во всех точках своего возможного фазового пространства (им-

пульс – координата). Это означает, что средние параметры, описывающие состояние системы, перестают флуктуировать и становятся устойчивыми и адекватными параметрами.

Важно отметить, что хаотизация движения возникает не только и даже не столько из-за большого числа шаров (хотя это тоже способствует развитию хаоса), но главным образом из-за собственной неустойчивости траектории каждого шарика! Степень этой неустойчивости определяется величиной Q (формула 2.7), которая всегда больше 1 и поэтому всегда приводит к хаотизации за конечное время τ . Однако превышение Q над 1 существенно зависит от параметров системы: при $R \ll l$, т.е. для короткодействующих сил взаимодействия между частицами (как «удары» в случае бильярдных шаров), $\langle \ln Q \rangle$ велико и N' мало, хаос наступает быстро; для дальнедействующих сил (гравитационные или кулоновские силы, когда $R \approx l$), $\langle \ln Q \rangle$ мало, и система может долго оставаться динамической, даже при большом числе частиц (как звезды на небе).

В то же время малое число частиц ещё не гарантирует устойчивости их динамических траекторий. Так, траектория одного шара на столе с выпуклой стенкой (рис. 2.3) (бильярд Я.Г. Синая) тоже неустойчива и через свое характерное время приобретает хаотический характер.

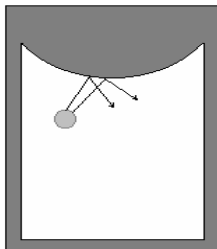


Рис. 2.3. Бильярд Синая.

Разумеется, подобные результаты можно получить, рассматривая и другие более сложные модели движений и взаимодействий. Но общий вывод из идеи Н.С. Крылова ясен: *причиной перехода системы из динамически определённой к стохастической является не большое число её степеней свободы, а неустойчивость индивидуальных траекторий движения по отношению к бесконечно малым внешним возмущениям.*

По этой причине невозможно обратить движение. Замена всех скоростей на противоположные не приведет к восстановлению перво-

начального состояния, т.к. решение обратной задачи тоже неустойчиво. В этом причина макроскопической необратимости.

Этот вывод, часто недооцениваемый в общей физике, особенно важен для *биофизических* объектов. Возможность (и необходимость) описания системы на языке механики (динамики) или статистики (термодинамики) на определенном этапе её жизни зависит от характерных времен хаотизации её подсистем. Как газ под поршнем в макроскопической системе может одновременно описываться термодинамически для газа (через давление и температуру) и динамически для поршня (через его скорость и координату), так и макромолекула в растворе может являться сложным объектом, состоящим из термодинамических и динамических систем. К сожалению, многие объекты относятся к самым сложным промежуточным случаям, когда они не являются ни динамической, ни термодинамической системой. Однако, вероятно, большинство биологически важных макромолекул, молекулярных комплексов, таких, как ферменты, фрагменты рибосом, митохондрий, комплексы нуклеиновых кислот с белками, могут быть описаны как машины, (типа поршень и газ) в которых долгоживущие механические степени свободы соседствуют с быстро термализуемыми подсистемами. Распределение энергии по степеням свободы в таких объектах зависит от того, на какие именно степени свободы поступает извне свободная энергия. Можно думать, что длительная эволюция отобрала молекулярные устройства, которые обеспечивают достаточно долгую жизнь отдельных «горячих» степеней свободы, успевающих использовать кванты энергии значительно большие kT на «полезные» акты прежде, чем они распределяться по остальным степеням свободы. Эргодическая гипотеза здесь, очевидно, не справедлива.

Обратимся теперь к понятию энтропии:

$$S \sim \ln W \quad (2.16)$$

Статистический вес W – число доступных микроскопически различных состояний или число возможных механических решений, которыми может быть описано данное макроскопическое состояние.

Если система устойчива, то доступным является единственное динамическое решение. $W=1$, $S=0$. Если, наоборот, все степени свободы одинаково сильно неустойчивы, то доступны все траектории. В этом случае система проводит основное время в состоянии с наибольшим W , а энтропия максимальна. Это и есть термодинамическое равновесие в котором энтропия имеет четкий смысл. Если степени свободы можно надежно разделить на две группы: оди-

наково устойчивые и одинаково сильно не устойчивые, то можно говорить о термодинамическом равновесии лишь для второй группы. Понятия W и S , однако, сохраняют четкий смысл. Такие системы хорошо известны: это опять газ в цилиндре под поршнем. Сам цилиндр с поршнем является устойчивой динамической системой и не дает вклад в общую энтропию системы S , которое определяется исключительно молекулами газа. Стенки сосуда с точки зрения термодинамики – гигантская флуктуация, которая, однако, рассасывается бесконечно долго. Таким образом, критерием разделения всей системы на динамические и статистические части является различие характеристических времен релаксации. В случае газа под поршнем такое разделение обычно даже не оговаривается, оно очевидно.

Однако если τ в различных компонентах системы различаются, но не сильно, то ситуация резко усложняется. Оговорка – доступность степени свободы становится очень важной и надо каждый раз примеряться к их доступности на интересующем их интервале времени. Положение усложняется ещё больше в неизолированных системах. Здесь становится важным, *через какие степени свободы* энергия поступает в систему и *на какие* степени свободы она успевает распространиться. Однако эта проблема все ещё остается мало изученной.

Вернемся к вопросу о применимости законов термодинамики к живым системам.

Первый принцип термодинамики.

Его справедливость для живых систем показана с точностью до 0,1 % в опытах с использованием калориметра.

$$\text{Для открытой системы:} \quad dU = \delta Q - pdV, \quad (2.17)$$

$$\text{Для закрытой:} \quad dU = d\Phi - pdV, \quad (2.18)$$

$\delta\Phi$ – суммарный поток энтальпии, обусловленный переносом и тепла, и вещества, а pdV уже не есть чистая работа (сюда входит прирост dV из-за притока вещества).

Второй принцип термодинамики (в формулировке Клаузиуса).

В любой системе

$$dS \geq \frac{\delta Q}{T} \quad (2.19)$$

В изолированной

$$\delta Q = 0 \text{ и } dS \geq 0 \quad (2.20)$$

Для обратимого процесса

$$dS = \frac{\delta Q}{T} \quad (2.21)$$

Перепишем (2.19) в другом виде:

$$dS - \delta Q/T \equiv \delta Q'/T \geq 0 \quad (2.22)$$

$\delta Q'$ – *некомпенсированная* теплота процесса – эквивалентна дополнительному теплу, которое надо было бы подвести к системе обратимым образом, чтобы увеличить энтропию фактического значения против теоретического при обратимом процессе. Это очень условно. Но $\delta Q/T$, имеющая размерность энтропии, имеет четкий смысл: это возникновение энтропии dS_i в системе из-за необратимости процесса. Если

$$\delta Q'/T \equiv d_i S, \text{ то } dS = d_e S + d_i S, \quad (2.23)$$

где $dS_e = \delta Q/T$ обусловлено обменом с окружающей средой и может иметь любой знак!

Второе начало накладывает ограничения лишь на $d_i S > 0$, а полная энтропия может меняться произвольным образом: $dS \gtrless 0$!

Скорость возникновения энтропии внутри системы:

$$\sigma \equiv d_i S/dt \quad (2.24)$$

Её иногда называют диссипативной функцией. Она характеризует скорость диссипации свободной энергии из-за необратимости процессов в системе.

По Шредингеру организм питается отрицательной энтропией из окружающей среды ($d_e S < 0$), уменьшая или поддерживая неизменной свою полную энтропию. Общее изменение энтропии *организм + среда*, естественно, положительно, как и требует второе начало.

Как выразить необратимость процессов через термодинамические потенциалы?

Выразим δQ из (2.22):

$$\delta Q = TdS - \delta Q' \quad (2.25)$$

и подставим в выражение первого начала (2.17):

$$dU + pdV = TdS - \delta Q' \quad (2.26)$$

или

$$dU = TdS - pdV - \delta Q' \quad (2.26)$$

$$\text{При } S, V = \text{const}, dU = -\delta Q' \leq 0 \quad (2.28)$$

Это критерий направления спонтанного процесса при $S, V = \text{const}$. В этих условиях U должно спонтанно уменьшаться. Таким образом, направление уменьшения внутренней энергии указывает естественное направление событий в системе при этих условиях.

Запишем выражение для энтальпии:

$$H = U + pV \quad dH = dU + pdV + Vdp = TdS + Vdp - \delta Q' \quad (2.29)$$

$$\text{При } S, p = \text{const} \quad dH = -\delta Q' \leq 0, \quad (2.30)$$

т.е. при этих условиях самопроизвольно должна уменьшаться энтальпия.

Выразим свободную энергию Гельмгольца:

$$F = U - TS \quad dF = dU - TdS - SdT = -pdV - SdT - \delta Q' \quad (2.31)$$

$$\text{При } VT = \text{const} \quad dF = -\delta Q' \leq 0 \quad (2.32)$$

Свободная энергия Гиббса:

$$G = H - TS, \quad dG = dH - TdS - SdT = Vdp - SdT - \delta Q' \leq 0 \quad (2.33)$$

$$\text{При } p, T = \text{const} \quad dG = -\delta Q' \leq 0 \quad (2.34)$$

В двух последних случаях направление самопроизвольного процесса определяется уменьшением свободной энергии.

В отличие от процессов в системах макроскопических, которые обычно сводятся к перемещению тел в пространстве или изменению их температуры, не связаны с изменением энтропии и поэтому соответствуют уменьшению U или H , в микроскопических (химических, биологических) процессах S уже не постоянно и критерии направления принципиально иные: уменьшение F и G . Использование

опыта из макроскопической физики может привести к серьезным ошибкам. Рассмотрим, например, процесс плавления льда.

В таблице 2.1 представлены изменения термодинамических потенциалов, которые показывают, что правильное направление процесса действительно дает знак ΔF , но никак не ΔU .

Т а б л и ц а 2.1

$T^{\circ}\text{C}$	ΔU кк/м	$T\Delta S$ кк/м	ΔF кк/м
-10^0	-1343	1292	-52
0^0	-1436	1436	0
$+10^0$	-1526	1583	+54

Вспомним, кстати, физический смысл F . Из (2.17) получим для работы, совершаемой системой:

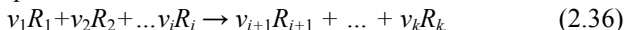
$$dA = pdV = -dF - SdT - \delta Q' \quad (2.35)$$

При $T=\text{const}$ $dA = -dF - \delta Q'$ и достигает максимума при обратимом процессе, когда $\delta Q' = 0$. Таким образом, свободная энергия характеризует *максимальную* работу, которую может совершить система при *изотермических* условиях.

После получения выражений для *направления* самопроизвольных процессов через изменения термодинамических потенциалов естественно было бы получить выражения для *скоростей* необратимых процессов. Однако сделать это не просто. Знакомство с формальным аппаратом неравновесной термодинамики начнем с формализма химической термодинамики, развитого Гиббсом.

2.2. Формализм химической термодинамики.

Продвинуться к поставленной цели поможет предположение о *частичном* равновесии. Пусть в системе реагентов установились все виды термодинамического равновесия (исчезли пространственные перепады давления, концентраций, температуры) и остались лишь неравновесные значения активностей реагентов. Пусть оставшиеся неуравновешенные химические компоненты претерпевают изменения в соответствии с реакциями:



где v_i – стехиометрические коэффициенты. Если v_i в левой части уравнения считать отрицательными, а в правой положительными, то из (2.36) получим

$$\sum v_i R_i = 0 - \text{стехиометрическое уравнение реакции (2.37)}.$$

Естественно считать, что для каждой конкретной реакции типа (2.37) должен существовать свой характерный для данной реакции параметр, ξ , определяющий её состояние на пути протекания реакции. Пусть μ_i – молекулярная масса i -го – компонента. Тогда для текущих масс реагентов можно записать:

$$m_i - m_{i0} = v_i \mu_i \xi, \quad (2.38)$$

$$m_k - m_{k0} = v_k \mu_k \xi$$

или для числа молей:

$$n_j - n_{j0} = v_j \xi$$

В силу закона сохранения массы суммирование строк даёт:

$$0 = \xi \sum_{j=1}^k v_j \mu_j \quad (2.39)$$

Здесь $\xi \equiv$ координата реакции, степень её полноты. $0 \leq \xi \leq 1$. При $\xi = 1$ (один шаг реакции) прошёл один эквивалент реакции. Складывая (2.38) и, помня о законе сохранения массы, получим для изолированной системы реагентов: *стехиометрическое соотношение*. ξ наряду с P , T при заданном m_{i0} полностью характеризует состояние системы и, следовательно, является *термодинамическим параметром*.

Пример: $\text{H}_2\text{O} = \text{OH}^- + \text{H}^+$

$$n_1 = n_{10} - \xi, \quad n_2 = n_3 = \xi,$$

т.е. ξ – это степень диссоциации в химическом смысле.

Дифференцирование (2.38) по времени даёт:

$$\frac{dm_i}{dt} = v_i \mu_i \frac{d\xi}{dt} \quad (2.40)$$

$$\frac{dn_i}{dt} = v_i \frac{d\xi}{dt}$$

или

$$\frac{d\xi}{dt} = V(t) \equiv \text{скорость реакции} = \frac{dm_i}{M_i \nu_i dt} = \frac{dn_i}{\nu_i dt}. \quad (2.41)$$

Если в системе протекает r различных реакций типа (2.37), то появится дополнительный индекс ρ – номер реакции:

$$\sum_{i=1}^k \nu_{i\rho} R_j = 0; \quad \sum_{i=1}^k \nu_{j\rho} \mu_j = 0; \quad \rho = 1, 2 \dots r, \quad (2.42)$$

$$\frac{dn_i}{dt} = \sum_{\rho=1}^r \nu_{i\rho} V_{\rho}, \quad V_{\rho} \equiv \frac{d\xi_{\rho}}{dt}. \quad (2.43)$$

Здесь ξ_{ρ} – координата, V_{ρ} – скорость ρ -й реакции.

Сколько реакций линейно независимы, т.е. сколько степеней свободы ξ_{ρ} у системы? Ответ на это дает критерий Жуге: число независимых переменных равно рангу матрицы, составленной из стехиометрических коэффициентов $\| \nu_{i\rho} \|$.

Вернемся к системе, в которой имеются и химические и термодинамические степени свободы: T , P , n_i могут изменяться, но одновременно по всей системе – так называемое *частичное равновесие*. Рассмотрим сначала случай одной реакции. Пусть термодинамические потенциалы являются функцией, например, T , V , n_i или T , V , ξ при заданном n_{io} .

Объединим 1 и 2 начала термодинамики для закрытой системы. Из (2.22) получим:

$$\delta Q' = TdS - \delta Q, \quad (2.44)$$

а δQ выразим из (2.17): $\delta Q = dU + pdV$ и подставим в (2.27):

$$\delta Q' = TdS - dU - pdV, \quad (2.45)$$

Будем считать $S = S(T, V, \xi)$, тогда:

$$dS = \left(\frac{\partial S}{\partial T} \right)_{U, \xi} dT + \left(\frac{\partial S}{\partial V} \right)_{T, \xi} dV + \left(\frac{\partial S}{\partial \xi} \right)_{T, V} d\xi, \quad (2.46)$$

аналогично, $U = U(T, V, \xi)$:

$$dU = \left(\frac{\partial U}{\partial T} \right)_{V, \xi} dT + \left(\frac{\partial U}{\partial V} \right)_{T, \xi} dV + \left(\frac{\partial U}{\partial \xi} \right)_{T, V} d\xi, \quad (2.47)$$

Теперь из (2.45):

$$\delta Q' = \left[T \left(\frac{\partial S}{\partial T} \right) - \left(\frac{\partial U}{\partial T} \right) \right]_{V, \xi} dT + \left[T \left(\frac{\partial S}{\partial V} \right) - \left(\frac{\partial U}{\partial V} \right) - P \right]_{T, \xi} dV + \left[T \frac{\partial S}{\partial \xi} - \frac{\partial U}{\partial \xi} \right]_{T, V} d\xi \geq 0. \quad (2.48)$$

Независимые переменные dT и dV могут иметь любой знак, а $\delta Q'$ всегда ≥ 0 . Это значит, что выражения в скобках при dT и dV равны нулю. Таким образом:

$$\delta Q' = \left[T \frac{\partial S}{\partial \xi} - \frac{\partial U}{\partial \xi} \right]_{T,V} d\xi = \left(\frac{\partial F}{\partial \xi} \right)_{T,V} d\xi. \quad (2.49)$$

Этот же результат можно получить короче, непосредственно используя уравнение Гиббса:

$$dU = TdS - pdV + \sum_i \left(\frac{\partial U}{\partial n_i} \right)_{SV} dn_i = TdS - pdV + \sum_i \mu_i \nu_i d\xi, \quad (2.50)$$

где μ_i – химический потенциал i -го реагента (не путать с молекулярной массой в (2.38–2.42)!).

Сравнивая это выражение с выражением для dU из (2.45), получим формулу (2.45) в несколько более общем виде:

$$\delta Q' = -\sum_i \mu_i \nu_i d\xi = -\left(\frac{\partial F}{\partial \xi} \right)_{T,V} d\xi \equiv \left(\frac{\partial G}{\partial \xi} \right)_{T,P} d\xi \equiv \left(\frac{\partial U}{\partial \xi} \right)_{S,V} d\xi \equiv \left(\frac{\partial H}{\partial \xi} \right)_{S,P} d\xi, \quad (2.51)$$

Производные от потенциалов по координате называются *химическим средством реакции*. Обозначая его буквой A , получим из (2.49) или (2.51):

$$\frac{\delta Q'}{dt} = T \cdot \frac{d_i S}{dt} = T \cdot \sigma = A \cdot \frac{d\xi}{dt} = AV \geq 0, \quad (2.52)$$

где V – скорость реакции.

Это важное соотношение называется неравенством де-Донде (1937 г.).

В чем его интерес:

если $A > 0$, то $V > 0$.

если $A < 0$, то $V < 0$.

если $A = 0$, то $AV = 0$, т.е. реакция обратима, а значит, $V = 0$.

Как видим, V имеет тот же знак, что и A , и обращается в 0 тогда, когда $A = 0$. Обратное же, вообще говоря, не верно: $V = 0$ может означать истинное равновесие когда $A = 0$ но может и ложное, когда $A \neq 0$, а реакция не идет из-за кинетических ограничений (без катализатора, фермента).

Итак, $A=0$ является необходимым и достаточным условием истинного равновесия. $A(T,V,\xi)=0$ – уравнение, определяющее некую поверхность $\xi=\xi(TV)$ на которой имеется равновесие, и которая отделяет область с $A<0$, от области $A>0$ (рис. 2.4).

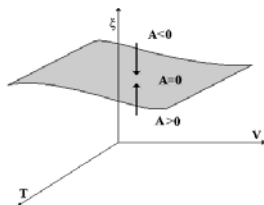


Рис. 2.4

Но особую ценность неравенство де-Донде приобретает для случая нескольких одновременных в одном месте реакций:

$$\delta Q' = \sum_{\rho=1}^r A_{\rho} d\xi_{\rho} \geq 0, \quad (2.53)$$

$$\sigma = \frac{1}{T} \sum_{\rho=1}^r A_{\rho} V_{\rho} \geq 0. \quad (2.54)$$

При этом, используя (2.24) получим:

A_{ρ} – сродство ρ -ой реакции. Здесь неравенство относится лишь к сумме! И отсюда возникает принципиально новый момент. Отдельные слагаемые суммы $A_{\rho} V_{\rho}$ могут теперь иметь отрицательный знак! Но $A_{\rho} V_{\rho} < 0$ означает, что ρ -ая реакция в данной системе идет в сторону, противоположную той, которую ей диктует её собственное (невозмущенное сопряжением) сродство, т.е. куда она шла бы, если бы была изолированной. Здесь нет противоречия со вторым началом термодинамики. Положительность полной функции диссипации обеспечивается при этом большой величиной σ_{ρ} «сопрягающих» реакций. Например, для $r=2$: $A_1 V_1 + A_2 V_2 \geq 0$. Пусть $|A_1 V_1| > |A_2 V_2|$, тогда $A_2 V_2$ может быть < 0 , но при этом появляется ограничение на скорость сопряженной реакции:

$$V_2 \leq |A_1 V_1 / A_2|, \quad (2.55)$$

Реакция 1 называется сопрягающей, 2 – сопряженной.

Таким образом, A_{ρ} приобретает важное значение для анализа V_{ρ} . Физический смысл химического средства ρ – ой реакции достаточно прост: это мера скорости падения свободной энергии системы реагентов в процессе протекания ρ -ой реакции. Численно его значение сов-

падает с изменением свободной энергии реакции, когда она продвигается на один шаг ($\xi = 1$), т.е. когда прореагируют стехиометрические количества реагентов. Но знак его по определению противоположен: чем сильнее *убывает* свободная энергия системы, тем более *положительна* сила, движущая процесс, т.е. A_p .

В общем случае для любого числа независимых реакций

$$A_p = - \sum_{j=1}^k \nu_{pj} \mu_j \quad (2.56)$$

Условие истинного равновесия:

$$A_p = 0 \text{ или } \sum_{j=1}^k \nu_{pj} \mu_j = 0, \quad (2.57)$$

Это соотношение не следует путать с формулой (2.39), они имеют совершенно разный смысл.

Значение A_p , как и ΔG_p , выражается через стандартную часть, соответствующую превращению реагентов при стандартных условиях (нормальном давлении, комнатной температуре и активности реагентов, равных 1 м/л) и добавку, учитывающую отличие активностей от стандартных значений:

Эта формула наглядно отражает очевидный факт: чем больше активность субстратов реакции, входящих в левую часть уравнения (2.30) (т.е. имеющих отрицательные ν_{pi}), тем больше сродство.

$$A_p = A_p^0 - RT \ln \prod_{j=1}^k a_j^{\nu_{pj}} \quad (2.58)$$

Первый член в (2.58), *энтальпийный* по своей природе, отражает собственную энергетику акта взаимодействия реагентов, а второй, *энтропийный*, отвечает за вероятность встречи реагентов.

Подставляя (2.58) в условия равновесия реакций (2.57), получим

$$A_p^0 = -RT \ln \prod_{j=1}^k a_{j \text{ равн.}}^{\nu_{pj}} \quad (2.59)$$

Т.к. константа равновесия по определению

$$K_p = \prod a_{j \text{ равн.}}^{\nu_{pj}}, \quad (2.60)$$

то

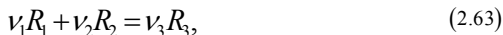
$$K_p = e^{A_p^0 / RT} \text{ и } RT \ln K_p = - \sum_{j=1}^k \nu_{pj} \mu_{oj} \quad (2.61)$$

где μ_{oj} – стандартная часть химического потенциала j -го реагента:

$$\mu_j = \mu_{oj} + RT \ln a_j. \quad (2.62)$$

Итак, соотношение де-Донде (2.55) указывает на принципиальную возможность термодинамического сопряжения двух реакций, т.е. на обращение скорости сопряженной реакции за счет большого сродства сопрягающей реакции. Действительно, в живых системах протекание процессов против их естественного сродства, это типичное явление, делающее возможным возникновение и поддержание устойчивого неравновесия в целом ряде важных клеточных систем за счет сопряжения их со спонтанно протекающими процессами. Множество примеров мы рассмотрим в дальнейшем. Соотношение де-Донде показывает, что в этом нет противоречия со вторым началом термодинамики. Посмотрим, однако, что говорит о такой возможности формальная химическая кинетика, основанная на законе действующих масс.

Рассмотрим пример простейшей химической реакции превращения веществ R_1 и R_2 в R_3 :



Её скорость $V = dn_3/dt$ (n – число молей) – это разность скоростей прямой и обратной реакции:

$$V = V_1 - V_2 = K_{1,2} [R_1]^{\nu_1} [R_2]^{\nu_2} - K_3 [R_3]^{\nu_3}, \quad (2.64)$$

где $K_{1,2}$ и K_2 – контрасты скоростей прямой и обратной реакции, $[R_i]$ – активности реагентов, а ν_1, ν_2, ν_3 , – положительные числа. Преобразуем (2.64). Здесь K – константа равновесия, равная $K_{1,2}/K_3$. С другой стороны – K можно связать с A по (2.61) и (2.58):

$$V = K_{1,2} [R_1]^{\nu_1} [R_2]^{\nu_2} \left(1 - \frac{K_3 [R_3]^{\nu_3}}{K_{1,2} [R_1]^{\nu_1} [R_2]^{\nu_2}} \right) = V_0 \left(1 - \frac{[R_1]^{-\nu_1} [R_2]^{\nu_2} [R_3]^{\nu_3}}{K} \right) \quad (2.65)$$

$$K = e^{-A_0/RT} = e^{\frac{A}{RT} + \ln [R_1]^{-\nu_1} [R_2]^{\nu_2} [R_3]^{\nu_3}}. \quad (2.66)$$

и получить из (2.66):

$$V = V_0 (1 - e^{-A/RT}), \quad (2.67)$$

Это достаточно общее выражение которое можно получить для любого другого вида реакций. О чем оно говорит? О том, что знак V всегда совпадает со знаком A ! Иначе говоря, *термодинамика* разрешает сопряженной реакции идти против её сродства, а *кинетика* не позволяет этого. Парадокс?! Нет. Просто условие возможности сопряжения (2.55) является необходимым, но не достаточным для реального сопряжения. Чтобы сопряжение в смысле изменения направления сопрягаемой реакции действительно произошло, необходим специальный физический механизм изменения знака сродства A_2 за счет части сродства A_1 , передаваемой из первой реакции во вторую.

Возможны 2 типа механизмов, обеспечивающих такое взаимодействие.

1. **Энергетический механизм.** Это передача части уменьшения свободной энергии системы при протекании первой реакции реагентам второй в виде какого-то вида работы над ними, увеличивающей их внутреннюю энергию или энтальпию, т.е. стандартную часть сродства, A_{20} . Это может быть деформация реакционного комплекса реагентов второй реакции, создание электрического поля, облегчающего взаимодействие реагентов, и т.п. Макромолекулы ферментов, осуществляющих сопряжение, могут реализовать такие процессы.
2. **Вероятностный (энтропийный) механизм.** Это затрата части реализуемой свободной энергии первой реакции на изменение активности реагентов второй реакции, т.е. увеличение второго, энтропийного члена в сродстве A_2 . Тривиальным примером является увеличение концентрации реагентов второй реакции, если обе реакции имеют общий продукт. Менее тривиальным, но более интересным примером является изменение при протекании первой реакции коэффициентов активности второй. Так, первая реакция может так изменить конфигурацию или свойства среды (поверхности), где протекает вторая реакция, что при той же концентрации её реагентов они станут более подвижными (например, десорбируются с поверхности) и увеличат вероятность своего участия в реакционном акте.

2.3 Элементы линейной неравновесной термодинамики

Прежде, чем продвигаться дальше, сделаем естественные обобщения. A , введенное нами как *химическое средство реакции* в соотношение де-Донде:

$$\sigma = \frac{d_i S}{dt} = \frac{AV}{T} \geq 0, \quad (2.68)$$

равное по определению – $(\partial F / \partial \xi)_{T, V = \dots}$, может иметь более общее значение, т.к. (2.68) и $\partial F / \partial \xi$ характеризует не только химическое превращение. Вытекающая из (2.68) связь знаков A и V характерна для большого круга процессов, когда скорость процесса *соразмерна* его движущей силе. Так бывает при диффузии, электро- и теплопроводности, когда соответствуют не только знаки A и v , но существует и пропорциональность между потоком некой величины и причиной («силой») его возвышающей: закон Ома $j \sim \text{grad } \varphi$; закон Фурье $j = \text{grad } T$; закон Фика $j = \text{grad } c$; закон Ньютона $j = \Delta C$ р.

Поэтому целесообразно ввести понятие *обобщенной силы* или *сродства* X и обобщенной скорости процесса (*потока*) J . Опыт учит, что

$$J \sim X, \quad (2.69)$$

а

$$d_i S / dt \sim JX. \quad (2.70)$$

Если в системе одновременно протекает r процессов, то естественно (2.69) и (2.70) обобщить до линейной комбинации:

$$J_\rho = \sum_j^r L_{j\rho} X_j, \quad (2.71)$$

$$\sigma = \frac{d_i S}{dt} = \sum_\rho J_\rho X_\rho \geq 0. \quad (2.72)$$

Соотношение (2.71) – *обобщение опыта*. Оно не может быть доказано в рамках термодинамики и является *феноменологическим линейным соотношением*. Но, если уж оно справедливо, то термодинамика позволяет сделать дополнительные утверждения. Для небольших отклонений от равновесия Онзагер (1931 г.) установил соотношение взаимности:

$$L_{ik} = L_{ki}, \quad L_{ik}(\mathbf{H}) = L_{ki}(-\mathbf{H}) \quad (\mathbf{H} - \text{напряжённость магнитного поля}), \quad (2.73)$$

т.е. матрица L_{in} – диагонально симметрична. В общем случае

$$L_{jj} > 0, \quad L_{ik}^2 < L_{ii} L_{kk}, \quad (2.74)$$

знак L_{12} – любой.

Если, например $r=2$, то $\sigma = L_{11}X_1^2 + (L_{12} + L_{21})X_1X_2 + L_{22}X_2^2 > 0$.

Отсюда:

$$\left. \begin{aligned} L_{11} > 0 \quad L_{22} > 0, \\ (L_{12} + L_{21})^2 < 4L_{11}L_{22} \rightarrow L_{12}^2 < L_{11}L_{22}. \end{aligned} \right\} \quad (2.75)$$

Если после этого обобщения вернуться к химическим реакциям, то, положив $X=A/T$, $J=V$, получим

$$J_{хим} = L \cdot X = L \cdot A/T, \quad (2.76)$$

$$\sigma = JX = L \left(\frac{A}{T} \right)^2 > 0.$$

Теперь утверждение о том, что скорость химической реакции пропорциональна химическому средству, получило феноменологическое обобщенное подкрепление.

Возникает законный вопрос: при каких условиях линейные соотношения справедливы?

Определим эти условия, сравнив два выражения для скорости – (2.76) из линейной термодинамики и точное (2.67) из химической кинетики.

Сопоставляя скорости реакций из этих выражений, видим, что они равны лишь при условии $A/RT \ll 1$, когда (2.67) можно разложить

$$V = \vec{V}_{(A=0)} \cdot \left(1 - 1 + \frac{A}{RT} - \frac{A^2}{2(RT)^2} + \dots \right) + \dots \cong \vec{V}_0 \cdot \frac{A}{RT} = \frac{L}{T} A, \quad L = \vec{V}_0 / R. \quad (2.77)$$

в ряд:

К сожалению, условие (2.77) выполняется реже, чем хотелось бы: при комнатной температуре $RT \approx 0,6$ кк/м = 3,5 кДж/м = 25 мЭв, а для многих биохимических реакций $A \approx 1 - 2$ кк/м и выше, т.е. $A \geq RT$!

Однако когда это неравенство не выполняется и притом сильно, то процесс можно представить себе как идущий через ряд последовательных стадий, каждую из которых можно охарактеризовать своим средством A_j и своей координатой ξ_j :

Если промежуточные вещества нестойки (а только в этом случае реакция идет насквозь), то должно быстро устанавливаться состояние, при котором

$$R_1 \xrightarrow{\xi_1} R_2 \xrightarrow{\xi_2} R_3 \longrightarrow \dots R_r, \quad (2.78)$$

$$V_1 = V_2 = \dots V_j = V \quad (2.79)$$

сохраняется линейность V и A_j (если $A_j < RT$): $V = V_j = L_j A_j \sim A$. Т.е. мы остаемся в рамках применимости линейных соотношений для это-

го (особого!) стационарного состояния ($V_f = \dots V_{\text{общ.}}$), хотя общее $A \geq RT$.

2.4. Стационарное состояние неравновесной системы

Только что мы рассмотрели стационарное состояние промежуточных продуктов химических реакций. Познакомимся подробнее с общими свойствами стационарного состояния, которое имеет такое же фундаментальное значение для открытых систем, как состояние равновесия для изолированных систем.

2.4.1. Теорема Пригожина

Сформулируем некоторые важные положения. Для наглядности проведем рассуждение на конкретном примере, а затем обобщим результаты. Рассмотрим хорошо известную неравновесную систему газ Кнудсена (рис. 2.5)

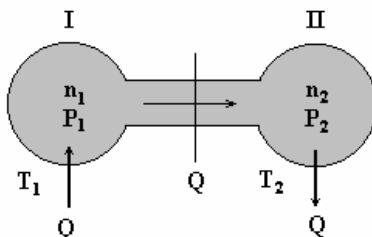


Рис. 2.5

В двух баллонах, связанных тонкой трубкой, находится газ. Концентрация газа, его давление и температура в баллонах n_1 , P_1 , T_1 и n_2 , P_2 , T_2 соответственно, газ может перетекать из одного баллона в другой через тонкую трубку. В условиях молекулярного течения плотность потока частиц пропорциональна $n \cdot V$, где V – средняя скорость частиц. В условиях динамического равновесия, когда потоки слева направо уравнились с потоком справа налево:

$$n_1 V_1 = n_2 V_2. \quad (2.80)$$

Если при этом T_1 и T_2 различаются и фиксированы, то V_i будучи $\sim \sqrt{T_i}$, будут различны, а значит, из (2.80) и n_i будут различны. Будут отличаться и давления P_i ($P = nkT$).

Таким образом, стационарность, т.е. неизменность во времени всех параметров системы, в то же время не будет равновесием, т.к. $n_1 \neq n_2$, $P_1 \neq P_2$ (если $T_1 \neq T_2$). Примем, что $T_1 > T_2$. Тогда через соедини-

тельную трубку будет перетекать поток тепла, т.к. при равном потоке частиц частицы, летящие слева, более *горячие*. Действительно, для поддержания $T_1 > T_2$ необходимо непрерывно подводить к левому баллону от внешнего нагревателя тепловой поток мощностью $\delta Q/dt$, а от правого непрерывно отбирать в холодильник такой же поток тепла. Но δQ , подводимое к левому баллону при температуре T_1 , означает введение в систему потока энтропии $d_i S/dt = (\delta Q/dt)T_1^{-1}$, а отвод δQ от правого баллона при температуре T_2 означает извлечение из системы потока энтропии $d_e S/dt = (\delta Q/dt)T_2^{-1}$. Легко видеть, что

$$\frac{d_e S}{dt} = \frac{d_i S}{dt} - \frac{d_2 S}{dt} < 0 \quad (2.81)$$

Но энтропия системы, как и все остальные термодинамические параметры, в стационарном состоянии должна быть неизменной. А это означает, что в стационарном состоянии скорость производства энтропии внутри системы $\sigma = d_i S/dt$ из-за протекания в ней необратимого диссипативного процесса (в данном случае переноса тепла от нагревателя к холодильнику) в точности компенсируется дефицитом поступления энтропии $d_e S/dt$ из окружающей среды.

$$\frac{dS}{dt} = \frac{d_e S}{dt} + \frac{d_i S}{dt} = 0, \quad (2.82)$$

Следует заметить, что любое текущее состояние газа Кнудсе-на описывается двумя независимыми параметрами: отношением тем-

$$\frac{P_1}{P_2} = \sqrt{\frac{T_1}{T_2}}, \quad \frac{n_1}{n_2} = \sqrt{\frac{T_2}{T_1}}. \quad (2.83)$$

ператур T_1/T_2 и P_1/P_2 (или, что эквивалентно, n_1/n_2). Первый параметр зафиксирован внешними условиями, а второй предоставлен сам себе, но в стационарном состоянии достигает вполне определенного значения, легко получаемого из (2.80):

Докажем теперь, что диссипативная функция σ в стационарном состоянии достигает экстремального значения.

По определению:

$$\sigma = \frac{d_i S}{dt} = J_T X_T + J_M X_M > 0, \quad (2.84)$$

где X_T – обобщенная сила, связанная с перепадом температур баллонов (например, $T_1 - T_2$), X_M – обобщенная сила, связанная с перепадом давления (например, $P_1 - P_2$), J_T – поток тепла через систему, J_M –

разностный поток частиц между баллонами. Из линейных соотношений (2.71) следует:

$$\left. \begin{aligned} J_T &= L_{11}X_T + L_{12}X_M \\ J_M &= L_{21}X_T + L_{22}X_M \end{aligned} \right\} \quad (2.85)$$

Здесь L_{IK} – онзагеровские коэффициенты.

Подставим (2.85) в (2.84) и учтем, что $L_{12} = L_{21}$

$$\sigma = L_{11}X_T^2 + 2L_{21}X_TX_M + L_{22}X_M^2, \quad (2.86)$$

Пусть, как и в нашем конкретном случае, $X_T = \text{const}$. Тогда

$$\left(\frac{\partial \sigma}{\partial X_M} \right) \Big|_{X_T} = 2(L_{21}X_T + L_{22}X_M) = 2J_M. \quad (2.87)$$

Но в стационарном состоянии $J_M = 0$. Следовательно

$$\left(\frac{\partial \sigma}{\partial X_M} \right) \Big|_{X_T} = 0 \quad (2.88)$$

Возьмем вторую производную от (2.83):

$$\frac{\partial}{\partial X_M} \left(\frac{\partial \sigma}{\partial X_M} \right) \Big|_{X_T} = 2L_{22} > 0, \quad (2.89)$$

Таким образом, диссипативная функция как функция от свободной переменной X_M в стационарном состоянии достигает экстремума, а именно *минимума*. Мы доказали *теорему И. Пригожина*. Сформулируем её словесно: «*Диссипативная функция открытой (неравновесной) системы, т.е. скорость диссипации свободной энергии,*

$$\left. \frac{\partial \sigma}{\partial X_M} \right|_{X_T = \text{const}} = 0, \quad J_M = 0 \quad (2.90)$$

в стационарном состоянии достигает минимума, совместимого с фиксированным значением обобщенной силы». Этот минимум достигается за счет изменения свободной обобщенной силы, которой система «распоряжается» сама. Математическое выражение этой важной теоремы сводится к формулировке условия минимума σ как функции двух переменных; и легко обобщается на случай большего числа переменных:

$$\left. \frac{\partial \sigma}{\partial X_i} \right|_{X_j = \text{const}} = 0 \quad J_i = 0 \quad (2.91)$$

где $j=1,2\dots k$ - индексы фиксированных обобщенных сил, $i=k+1\dots r$ - индексы остальных, свободных сил и потоков. Стационарность заключается в исчезновении i - тых потоков.

2.4.2 Поведение в окрестности стационарного состояния.

Если система в результате кратковременного воздействия (флуктуации некоторых обобщенных сил) выведена из стационарного состояния, т.е. σ получила положительное приращение $\Delta\sigma$, то какова дальнейшая эволюция σ после флуктуации. Представим изменения диссипативной функции в виде двух компонент:

$$d\sigma = d_X\sigma + d_J\sigma, \quad (2.92)$$

где

$$d_X\sigma = \sum J_i dX_i, \quad d_J\sigma = \sum X_i dJ_i. \quad (2.93)$$

Поведение $d\sigma$ определяется двумя теоремами.

Теорема 1. Если справедливы линейные феноменологические уравнения, соотношения взаимности Онзагера и $L_{ij} = \text{const}$, (т.е. стационарное состояние и его окрестность недалеко от равновесия), то

$$d_X\sigma = d_J\sigma \quad (2.94)$$

Доказательство:

$$\begin{aligned} d_X\sigma &= \sum_i J_i dX_i = \sum_i \left(\sum_K L_{iK} X_K \right) dX_i = \sum_{iK} X_K (L_{Ki} dX_i) = \\ &= \sum_K X_K dJ_K \equiv d_J\sigma \end{aligned} \quad (2.95)$$

Теорема 2: Если фиксирование обобщенных сил неизменно во времени, то во всей области справедливости термодинамики необратимых процессов

$$d_X\sigma \leq 0 \quad (2.96)$$

Доказательство этой теоремы в общем виде довольно громоздкое, и мы не будем его приводить; желающие могут ознакомиться с ним в книге И. Пригожина.

Объединяя обе теоремы, получим в итоге:

$$d\sigma = 2d_X\sigma \leq 0, \quad (2.97)$$

т.е. σ самопроизвольно возвращается к исходному минимальному значению.

Значит, если стационарное состояние недалеко от равновесия, то оно устойчиво по отношению к малым флуктуациям. Если стационарное состояние сильно не равновесно или флуктуации велики в этом же смысле, то вывод системы из первоначального состояния мо-

жет оказаться необратимым. Доказанные теоремы, таким образом не закрывают путь самопроизвольному развитию неравновесной системы как переходу из одного состояния в другое. Рис. 2.6 иллюстрирует это.

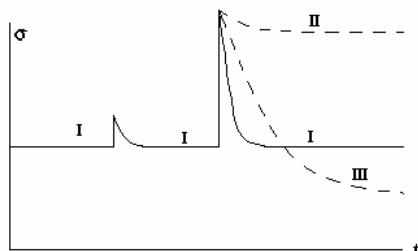


Рис. 2.6. Устойчивость состояния I к малым флуктуациям и возможные варианты «развития» системы (II, III) при больших возмущениях.

Теорема Пригожина и условия устойчивости стационарного состояния могут быть наглядно проиллюстрированы (рис. 2.7) для двух степеней свободы, при фиксированном значении X_1 .

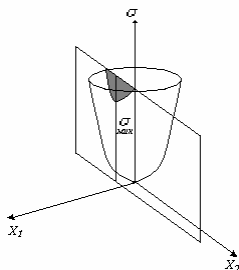


Рис. 2.7

Сечение параболоида плоскостью $X_1 = X_{10}$ вырезает из него кривую $\sigma(X_2)$, имеющую минимум в точке $X_2 = X_2^0$. Это условный минимум, не равный нулю и соразмерный фиксированному значению X_{10} .

Если же X_{10} «отпустить», то поиск минимума σ закончится опусканием в точку $\sigma=0$, при котором $X_1=0$, $X_2=0$ и стационарное состояние вырождается в состояние равновесия. В окрестности равновесия $\sigma(X_1, X_2)$ представляет собой гладкий параболоид, однако при больших X_1 или X_2 на кривой могут появиться складки и карманы, создающие области со своими минимума σ , куда состояние системы

может попасть при больших флуктуациях, как это показано на рис. 2.6.

Указанные теоремы можно рассматривать как обобщение принципа Ле-Шателье–Брауна. Этот принцип, как известно, констатирует устойчивость *равновесного* состояния *изолированной* системы, утверждая, что процессы, вызываемые в системе внешними воздействиями, всегда направлены на уменьшение первоначального отклонения от состояния равновесия. Приведенные теоремы позволяют говорить о подобных свойствах неравновесной, но *стационарной* открытой системы. Многочисленные примеры такой устойчивости (*гомеостаза*) мы увидим при знакомстве с конкретными живыми системами и подсистемами. Однако механизмы многих из этих процессов имеют общую термодинамическую природу, отражающую универсальные свойства открытой системы вблизи стационарного состояния. Эту мысль можно проиллюстрировать простыми примерами.

Примеры гомеостатического поведения.

Рассмотрим простейшую открытую систему: плоскую полость с толщиной h с безграничной шириной. Пусть она помещена в безграничный раствор некоторого вещества, которое может проникать в полость через её боковые грани (рис. 2.8.). Пусть проницаемость граней p_1 и p_2 , а концентрация вещества слева и справа от полости низменны и равны a_1 и a_2 , соответственно.

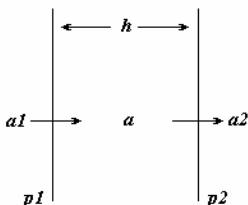


Рис. 2.8

Тогда для концентрации вещества a внутри полости можно записать балансовое уравнение:

$$h \cdot \frac{da}{dt} = p_1(a_1 - a) - p_2(a - a_2) \quad (2.98)$$

Считаем, что внутри полости вещество быстро перемешивается, так что его концентрация по толщине полости одинакова. Решение уравнения (2.98) имеет вид:

$$a = a_{\infty} + (a_0 - a_{\infty})e^{-t/\tau}, \quad (2.99)$$

где

$$\left. \begin{aligned} a_{\infty} = a(\infty) &= \frac{p_1 a_1 + p_2 a_2}{h(p_1 + p_2)} \\ a_0 = a(0), \quad \tau &= \frac{h}{(p_1 + p_2)} \end{aligned} \right\} \quad (2.100)$$

Это решение имеет характерные особенности:

1. Через $t \gg \tau$ выходит на асимптотический (стационарный) уровень, который не зависит от начального значения a .
2. Попытки изменить стационарное значение a_{∞} изменением a_1 и a_2 или p_1 и p_2 приведет лишь к ограниченному успеху. da_{∞}/da_1 и da_{∞}/da_2 меньше 1, а изменения a_{∞} при вариации p_1 и p_2 также невелики, т.к. p_1 и p_2 входят и в числитель, и в знаменатель a_{∞} . Кинетика перехода от a_0 к a_{∞} носит экспоненциальный характер.

Все эти три качества напоминают *гомеостаз* живой системы, хотя в конструкцию нашей простейшей модели не закладывались никакие специальные устройства, искусственно поддерживающие неизменность a_{∞} . Это свойство автостабилизации стационарного состояния возникает автоматически в любой открытой системе, в которой обобщенные потоки линейно связаны с обобщенными силами. Любое изменение a тут же вызывает соответствующее изменение притока и вывода вещества через границы системы, стабилизируя значение a . Второй пример позволяет учесть возможные химические превращения в объеме полости, моделируя «желудок и переваривание» (рис 2.9).

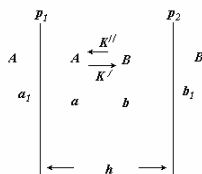


Рис. 2.9

Пусть слева от полости находится вещество A с неизменной концентрацией a_1 , а справа только B с неизменной концентрацией b_1 ,

а в полости они превращаются друг в друга по законам реакции первого порядка с константами скоростей K' и K'' .

Проницаемость левой грани к веществу A равна p_1 , а правой грани к B равна p_2 . Тогда кинетическое уравнение можно записать так:

$$\left. \begin{aligned} \frac{da}{dt} &= p_1(a_1 - a) + K''b - K'a, \\ \frac{db}{dt} &= K'a - K''b - p_2(b - b_1). \end{aligned} \right\} \quad (2.101)$$

Их решения имеют вид:

$$\left. \begin{aligned} a &= a_\infty + c_1 e^{-\lambda_1 t} + c_2 e^{-\lambda_2 t} \\ b &= b_\infty + c_3 e^{-\lambda_1 t} + c_4 e^{-\lambda_2 t} \end{aligned} \right\} \quad (2.102)$$

где λ_1, λ_2 – корни характеристического уравнения:

$$\left. \begin{aligned} a_\infty &= \frac{p_1 K'' a_1 + p_1 p_2 a_1 + p_2 K' b_1}{p_1 K'' + p_1 p_2 + p_2 K'}, \\ b_\infty &= \frac{p_1 K' a_1 + p_1 p_2 b_1 + p_2 K'' b_1}{p_1 K'' + p_1 p_2 + p_2 K'}. \end{aligned} \right\} \quad (2.103)$$

$$\lambda^2 - \lambda(p_1 + p_2 + K' + K'') + (p_1 p_2 + p_1 K' + p_2 K'') = 0. \quad (2.104)$$

Как легко видеть, λ_1 и λ_2 положительны. Здесь также, как и в предыдущем случае, через время $t > \lambda_1^{-1}, \lambda_2^{-1}$ система *забывает* о начальном положении и выходит на стационарное значение a_∞ и b_∞ , обладающие устойчивостью по отношению к изменению всех своих параметров. Однако, помимо этого свойства, напоминающего гомеостаз в живом объекте, данная система демонстрирует нетривиальную кинетику переходного процесса. При изменении параметров стационарные значения переходят к новым значениям тремя способами: монотонным и двумя немонотонными (рис. 2.10) в зависимости от начальных условий и значений λ_1 и λ_2 . Переходы такого типа характерны для многих биологических систем. Например, сложный переход с *овершутом* (тип 2) напоминает изменение уровня сахара в крови млекопитающих, а нетривиальный *ложный старт* (тип 3) – вариацию напряжения кислорода в корешках лука при изменении парциального давления O_2 .

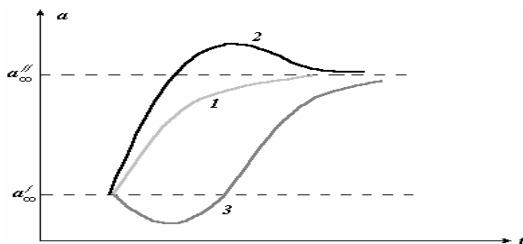
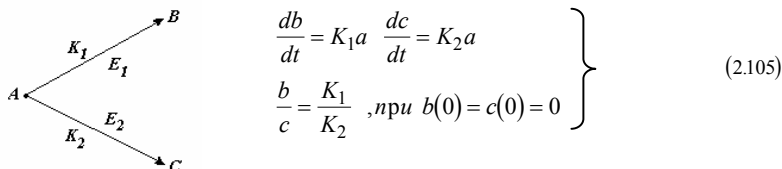


Рис. 2.10

Обычно предполагается, что такие сложные переходные процессы отражают работу специальных устройств контроля и регулирования. Но, как видим, это может быть простым свойством открытых неравновесных систем, в которых автостабилизация стационарного состояния происходит сама собой.

Вообще, следует сказать, что представление о необходимости существования сложных специальных устройств, регулирующих контроль и управление в живых клетках и тканях, вероятно, сильно преувеличено. Сложное *целесообразное* поведение живых объектов может быть обеспечено простыми механизмами, основанными на свойствах открытых систем и кинетики реакции, подчиняющихся закону действующих масс. А если скорости реакций определяются катализаторами (ферментами), то уже простейшие предположения о свойствах ферментов позволяют понять и описать всю сложность поведения биохимической системы.

Так, например, если вещество A способно участвовать в двух альтернативных превращениях по типу реакций первого порядка, давая два разных продукта B и C , то для их концентрации a , b , c соответственно можно записать:



Наблюдая за ростом концентрации веществ B и C , мы будем фиксировать $b \gg c$, если $K_1 \gg K_2$. При большой концентрации вещества B можно даже не заметить в этих условиях присутствие вещества C . Однако если реакции ферментативные и неравенство $K_1 \gg K_2$ обусловлено высокой активностью фермента E_1 при его концентрации значительно более низкой, чем концентрация фермента E_2 , то с ростом концентрации исходного вещества может произойти насыщение скорости первой реакции. Если при этом константа K_2 остается неизменной, то нарастающая концентрация вещества C может значительно превысить концентрацию вещества B (рис 2.10). Создается ошибочное впечатление о наличии специального переключателя скоростей процессов при $a = a^*$, которого на самом деле нет. При этом мы не делали никаких дополнительных предположений о свойствах ферментов, кроме тривиальной зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (уравнение Михаэлиса-Ментен):

$$V = V_{\text{макс}} \frac{[S]}{[S] + K_M}, \quad (2.106)$$

где $[S]$ – концентрация субстрата, K_M – константа Михаэлиса, зависящая лишь от молекулярных параметров фермента и субстрата.

В более общем случае, когда K_M может зависеть от концентрации субстрата и (или) других веществ, поведение системы может стать неизмеримо сложнее и способно описать большой класс реально наблюдаемых свойств биохимических процессов. При этом в основе кинетики процессов по-прежнему лежит закон действующих масс, но константы скоростей перестают оставаться постоянными. Факторами, влияющими на активность ферментов, иногда выступают молекулы АТФ, но чаще циклические АМФ, концентрация которых в свою очередь контролируется гормонами.

В совокупности эти проявления обратных связей и элементов регулирования констант скоростей создают сложную и динамичную структуру системы взаимопревращений веществ в биохимических системах. Её анализ представляет собой сложную задачу. Однако есть несколько подходов, позволяющих значительно упростить её. Прежде всего это два известных принципа упрощения вида сложной сети. Первый – принцип Либиха (принцип узкого места): в последовательной цепи превращений наибольшее влияние на скорость образования конечного продукта оказывает реакция с наименьшей скоростью. Второй – принцип Хиншельвуда: в системе альтернативных процессов важными являются те, которые идут с наибольшими скоро-

стями и остаются реакциями первого порядка (т.е. не насыщаются) в наибольшем диапазоне концентраций субстратов. Использование этих простых принципов позволяет исключить из сети превращений менее существенные.

Важным для дальнейшего упрощения является редукция системы, основанная на анализе временной иерархии процессов. Часто систему кинетических уравнений для концентрации реагентов X системы можно разбить на три группы: I, II, III:

$$\left. \begin{aligned} \text{I. } \frac{dX_i}{dt} &= \frac{1}{r_i} F_i(X_1, \dots, X_n), \\ \text{II. } \frac{dX_j}{dt} &= \frac{1}{r_j} F_j(X_1, \dots, X_n), \\ \text{III. } \frac{dX_k}{dt} &= \frac{1}{r_k} F_k(X_1, \dots, X_n), \end{aligned} \right\} \quad (2.107)$$

где характерные времена τ_i, τ_j, τ_k для концентрации X в группах реагентов I, II, III соответственно удовлетворяют условию:

$$\tau_i \ll \tau_j \ll \tau_k. \quad (2.108)$$

На интервале времен $t \gg \tau_I$ концентрации реагентов группы I успевают достигнуть своих стационарных концентраций и их динамику можно описать алгебраическим уравнением,

$$F_i(X_i, \dots, X_n) = 0 \quad (2.109)$$

вместо дифференциального.

На интервале $t \gg \tau_{III}$ концентрации реагентов группы III не успевают измениться, и их можно считать постоянными, заданными в начальный момент:

$$X_k = X_{k0} = \text{const} \quad (2.110)$$

В итоге исходная система редуцируется и на интервале $t \approx \tau_i$ приобретает существенно меньший порядок.

$$\frac{dX_j}{dt} = \frac{1}{\tau_j} F_j(X_1, \dots, X_n) \quad (2.111)$$

Управление такой редуцированной системой значительно упрощается: за переменными группы I не нужно следить, а переменные группы III приобретают смысл управляющих препаратов. Живая природа в процессе эволюции не могла пройти мимо этой возможности, ибо подобное упрощение системы увеличивает её надёжность. Этот принцип простоты остроумно сформулировал философ екатерининских времен

Г.С. Сковорода, сказавший примерно следующее: «Слава тебе, боже, за то, что ты сделал все нужное простым, а все сложное – ненужным!»

Этот принцип должен давать организмам большие преимущества в борьбе за существование. Те же, кто его не успел использовать в ходе эволюции, должны были вымереть. Если это так, то должна сложиться парадоксальная ситуация: математическое моделирование живой биохимической системы должно быть проще, чем математическое моделирование искусственного биохимического реактора с тем же количеством степеней свободы, т.к. последний ещё не прошёл естественного отбора.

Наглядным примером продуктивности использования вышеуказанного принципа простоты (точнее, принципа стационарных состояний, основанного на известной теореме А.Н. Тихонова) является история исследования системы гликолиза в живой клетке. Моделируя сложный метаболизм глюкозы, Чанс и Гарфинкель в середине прошлого века написали 22 дифференциальных уравнения и провели анализ их численных решений, используя имеющуюся в их распоряжении вычислительную машину. Этот анализ не выявил ничего интересного. В то же время Молчанов и Сельков, не имея такой технической возможности, провели более интеллектуальную атаку на эту систему и смогли редуцировать её к двум уравнениям:

$$\left. \begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= p - xy^2, \\ \frac{dy}{dt} &= xy^2 - x, \end{aligned} \right\} \quad (2.112)$$

где x и y , концентрации фруктозы-6-фосфата и АДФ, соответственно. Исследование системы (2.112) позволило предсказать возможность автоколебаний в системе гликолиза, которые впоследствии и были обнаружены экспериментально.

3. Основы биоэнергетики

3.1. Природные источники свободной энергии

Для поддержания состояния *устойчивого неравновесия* живой организм, очевидно, нуждается в постоянном притоке свободной

энергии. К важным особенностям живых систем, помимо уже упомянутых в предыдущем разделе, следует отнести способность самостоятельно извлекать свободную энергию из внешних источников в форме, пригодной для внутриклеточных процессов. Окружающая природа богата источниками энергии, однако далеко не все они удовлетворяют требованиям эффективности и доступности для живых организмов.

Прежде всего они должны позволять совершать работу в весьма ограниченном температурном интервале. Это сразу исключает в качестве основных источников биоэнергии резервуары тепла. Разумеется, внешние источники тепла могут использоваться для поддержания оптимальной температуры живого организма наряду с внутренними теплогенераторами, но их эффективность как источника подходящей свободной энергии ограничена теоремой Карно (см. формулу 2.2). На микроскопических размерах живой клетки невозможно создать и удерживать достаточную разность температур между *нагревателем* и *холодильником*, необходимую для сколь-нибудь заметного коэффициента преобразования.

Нельзя использовать энергию ядерных реакций из-за разрушительного влияния ионизирующего излучения на биоструктуры. Так, абсолютно смертельная для большинства теплокровных животных доза γ -радиации 10 Грей несёт энергию всего лишь 10 мДж на 1 грамм биомассы (что способно поднять её температуру на ничтожную величину $2 \cdot 10^{-3}$ градуса).

Невозможно *в принципе* использовать гравитационную энергию в непрерывном процессе и *практически* невозможно даже на отдельных этапах жизненного цикла из-за ничтожно малого потенциала энергии тяготения на микроскопических размерах клетки.

Проблематично также использование энергии внешних электрических, магнитных и электромагнитных полей радиочастотного диапазона. Энергия *статических* полей не может быть использована по тем же причинам, что и гравитационная энергия. Потенциальная энергия электрических зарядов в электрическом поле может быть реализована только при смещении зарядов, а оно ограничено и не может обеспечить непрерывного заимствования энергии от внешнего источника. Это же относится и к вращению магнитных диполей в живой клетке во внешнем статическом магнитном поле. Прецессия элементарных магнитных моментов, вызванная приложением магнитного поля, затухает, и устанавливается их равновесное распределение между двумя крайними уровнями энергии, соответствующими ориентации диполей по полю и против него. На этом преобразование энергии заканчивается. *Переменные* электрические и магнитные поля, вызывая

периодические изменения в распределении зарядов или диполей, в принципе могли бы непрерывно поставлять энергию в клетку. Но природные переменные электромагнитные поля весьма слабы и нестабильны для того, чтобы стать надёжным источником энергии. Конечно, это не исключает возможности их управляющего воздействия на процессы в живой системе, но это уже относится к другой проблеме.

Столь же нереально использование механической энергии деформации материалов окружающей среды. В напряжениях элементов земной коры сосредоточены гигантские запасы свободной энергии. Энергия крупномасштабных деформаций периодически выделяется при землетрясениях, но она не может быть использована живыми организмами из-за несоответствия размеров источника и приёмника деформационной энергии. Энергия же микромасштабных деформационных напряжений на подходящих для клетки атомно-молекулярных размерах является в сущности уже разновидностью химической энергии.

Неживая часть биосферы богата химической энергией. Неорганические вещества биосферы не находятся в химическом равновесии между собой и хранят громадные запасы энергии. Однако соответствующие химические реакции кинетически заторможены. Их реализация и получение энергии даже в виде тепла невозможно без катализаторов или физической (например, тепловой) активации реакций. Возможные химические реакции образуют чрезвычайно разнородное множество. Запуск этих реакций и особенно преобразование их энергии в вид, пригодный для реализации живой клеткой её биологических функций, потребовал бы наличия в клетке соразмерно огромного множества разнородных ферментных комплексов типа молекулярных машин, что практически невозможно. Но именно в химическом потенциале биосферы сосредоточен основной запас свободной энергии, перспективной для живых систем. И природа нашла выход из этой ситуации. Она выбрала в качестве источника биоэнергии один, но очень широкий класс химических процессов, а именно, окислительно-восстановительные реакции. В класс субстратов этих реакций входит огромное количество химически разнородных соединений и элементов, объединённых способностью к одному элементарному акту их взаимодействия: переносу электрона от одного субстрата (*донора* электрона) к другому (*акцептору* электрона). Часто это сопровождается практически одновременным переносом протона. Энергия, выделяющаяся при спонтанном протекании окислительно-восстановительной реакции, в принципе может быть сохранена в той

или иной форме свободной энергии, если перенос зарядов осуществляется с помощью специально устроенного ферментного комплекса («молекулярной машины»). А поскольку процессы переноса элементарных зарядов в различных донорно-акцепторных парах во многом похожи друг на друга, реализация окислительно-восстановительных процессов в большом множестве элементов и соединений может быть обеспечена сравнительно небольшим набором ферментных комплексов. Продукт окислительно-восстановительных превращений различных веществ может быть универсальным и в свою очередь может служить источником энергии для разнообразных биологически важных процессов в живой клетке. В отличие от преобразователя типа тепловой машины такое устройство может иметь высокий коэффициент преобразования свободной энергии, не ограниченный теоремой Карно (2.2). Очевидно, что реализация живой системой такого механизма получения свободной энергии из окружающей среды даёт ей огромные преимущества. И эволюция биоэнергетических механизмов живой природы пошла именно по этому пути.

Следует отметить также большую привлекательность лучистой энергии Солнца в качестве практически неисчерпаемого источника свободной энергии. Энергия квантов солнечного света в видимом диапазоне излучения (400-700 нм.) 1,7–3 электрон-вольта хорошо соответствует прочности типичных химических связей. В отличие от ионизирующей радиации она не столь велика, чтобы разорвать основные структурообразующие химические связи в клетке, но достаточна для электронного возбуждения некоторых молекул. Если возбуждённые степени свободы достаточно долгоживущие в указанном ранее смысле (т. е. имеют большое время тепловой релаксации), то эта энергия может быть преобразована в некоторую полезную форму свободной энергии, прежде чем превратится в тепло. Возбуждение светом электронных степеней свободы молекулы изменяет её окислительно-восстановительный потенциал и может стимулировать соответствующие реакции, легко сопрягающиеся с системой других окислительно-восстановительных превращений, имеющейся в клетке. Таким образом, физические механизмы преобразования световой энергии и энергии окислительно-восстановительных реакций могут в принципе естественным образом создать единую биоэнергетическую систему живой клетки. Как мы увидим дальше, живая природа широко использовала эту возможность.

Механическая, деформационная энергия на молекулярном масштабе также тесно связана с этой биоэнергетической системой. Действительно, если молекула имеет равновесную геометрическую

структуру расположения ядер своих атомов (равновесную *конформацию*), соответствующую состоянию своей электронной подсистемы, то изменение последней, вызванное окислительно-восстановительной реакцией или оптическим возбуждением, превращает конформацию молекулы в неравновесную, механически напряжённую. Это побуждает ядерную подсистему начать движение к новому равновесному положению. Одновременно изменяют своё положение и окружающие данную молекулу элементы среды, способные к электрической поляризации (процесс *пересольватации*). Для маленьких молекул и отдельных атомов в сильно полярной водной среде эта энергия *реорганизации среды* достигает 1–1,5 эВ. Для больших молекул этот вклад не столь значительный, но конформационная энергия может быть весьма существенной. Перестройка ядерной подсистемы происходит, в сущности, за счёт энергии электронной подсистемы и поэтому вызывает изменение величины окислительно-восстановительного потенциала молекулы, что в свою очередь изменяет её реакционную способность и величину соответствующего химического сродства. Это интересное *нелинейное* явление может лежать в основе некоторых процессов самоорганизации и саморегуляции. Если новое электронное состояние достаточно долгоживущее, то процесс реорганизации может пройти до конца. Характерная продолжительность этого процесса зависит от структуры, размера молекулы и её взаимодействия с окружением. Для изменения конформации большой молекулы фермента в целом может потребоваться время от миллисекунд до секунд. Для перестройки структуры в непосредственной близости от реакционного центра может быть достаточно и пико- или наносекунд. Энергия, выделяемая при конформационной перестройке, может полностью перейти в тепло, но в специально устроенных молекулярных машинах может использоваться для совершения механической работы или химических реакций. Таким образом, энергия механической деформации макромолекул может хорошо сопрягаться с биоэнергетической системой клетки и служить её естественной составной частью. Отдельные примеры этому мы увидим в дальнейшем, но в целом эта сторона биоэнергетики изучена пока недостаточно.

3.2. АТФ и макроэргическая фосфатная связь

По мере развития количественных методов исследования в биологии и расширения объектов биофизических исследований в поле зрения биофизики естественно попали проблемы преобразования энергии в живых системах. С начала тридцатых годов и до конца два-

дцатого века проблемы биоэнергетики наряду с проблемами молекулярной генетики были основными объектами биологической науки. Начинаясь как чисто биохимические, эти исследования со временем приобретали всё более биофизический характер и к концу века завершились фундаментальными биофизическими результатами.

В тридцатые–пятидесятые годы прошлого столетия было установлено, что химическая энергия пищевых субстратов переводится в химическую энергию связей неорганического фосфата (H_3PO_4) в составе молекул аденозинтрифосфата (АТФ), аденозиндифосфата (АДФ) и аденозинмонофосфата (АМФ) и используется для обеспечения элементарных процессов в клетке при гидролизе фосфатных связей, что процесс образования этих связей (*фосфорилирование*) сопряжён с реакциями окисления сахаров в клетках животных и бактерий, а также с процессом утилизации световой энергии в растениях и водорослях (В.А. Энгельгардт, Ф. Липман, Д. Арнон и др.). Фосфатные связи, хранящие эту энергию, получили название *макроэргических*. Последующие интенсивные исследования сотен учёных всего мира были направлены на уточнение и конкретизацию этих представлений и, главное, на изучение *механизма* сопряжения окисления *топливных* субстратов и реакции фосфорилирования.

Но прежде, чем ознакомиться с итогами изучения механизмов окислительного фосфорилирования, увенчанных несколькими Нобелевскими премиями, остановимся на физическом смысле макроэргической связи. Действительно, если макроэргическая фосфатная связь богата энергией (а при её гидролизе в стандартных условиях выделяется свободная энергия 7,3 ккал (30,4 кДж) на моль связей или 0,316 эв. на одну связь), она, казалось бы, должна быть нестабильной и спонтанно разрываться. На самом деле это достаточно стабильная связь, и молекулы АТФ, как и АДФ и АМФ, – реально существующие химические соединения. Однако фосфатная связь может стать ещё более стабильной, если фосфатную группу перенести на другой акцептор. Эта ситуация условно изображена на рис. 3.1, где энергия системы показана в функции от обобщённой координаты реакции отделения фосфатной группы от молекулы АТФ.

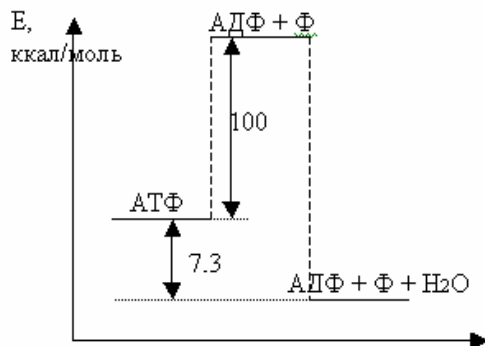
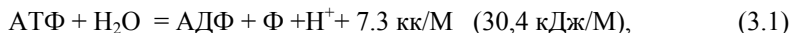
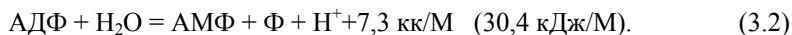


Рис. 3.1. Макроэргическая связь в АТФ. По горизонтальной оси - обобщённая координата процесса.

Отрыв фосфатной группы от остова молекулы АТФ с образованием изолированных продуктов в вакууме требует энергии около 100 ккал на моль, и в этом отношении молекула АТФ вполне устойчива. Однако если после этого умогильного процесса фосфатную группу перенести на воду, то новая система станет ещё более стабильной, чем исходная. Разница в энергии составит 7,3 ккал (или 30,4 кДж) на моль. Это и есть энергия гидролиза. В реальной водной среде живой клетки энергетический барьер, разделяющий два состояния, несколько меньше 100 ккал/М, но он достаточен, чтобы кинетически затормозить спонтанный процесс гидролиза. Это важное обстоятельство, т. к. оно исключает бесполезную диссипацию энергии и позволяет направить её в целесообразные для клетки реакции, контролируемые соответствующими ферментами. Именно специальная конструкция фермента может в принципе обусловить преобразование энергии и обеспечить сопряжение гидролиза с другими процессами. Это же относится и к обратному процессу фосфорилирования: только специально устроенный фермент может обеспечить запасание энергии экзогенных процессов в форме макроэрга АТФ. Молекула АТФ – не единственный обладатель макроэргической фосфатной связи. Достаточно часто используется макроэрг АДФ. Условно это изображают так:





Здесь Φ обозначает ортофосфат, который в водной среде клетки при нормальных условиях ионизован и имеет вид HPO_4^{2-} . Ионизованы и молекулы АТФ, АДФ и АМФ. Они имеют при нейтральном значении pH в клетке отрицательные заряды 4, 3, и 2 единицы соответственно. Выделяемая в реакции энергия (иначе, сродство процесса), показанная в уравнениях реакций, относится к стандартным условиям, т. е. активностям реагентов в 1 М/л., нейтральному значению pH и очень разбавленным растворам (когда активность воды, т.е. её молярная доля, также равна единице). Реальные активности могут значительно отличаться от стандартных, и величину сродства при этом нужно рассчитывать по формуле (2.58). Иногда для краткости в записи этих реакций опускают воду и ионы водорода, но об их участии в гидролизе не следует забывать. Рассмотрение точных химических формул участников рассматриваемых процессов не входит в задачи нашего предмета, но АТФ заслуживает исключения. В основе устройства молекулы АТФ лежит сахар рибоза, который связывает в единое целое три остатка фосфорной кислоты с одной стороны и с другой азотистое основание аденин (рис. 3.2).

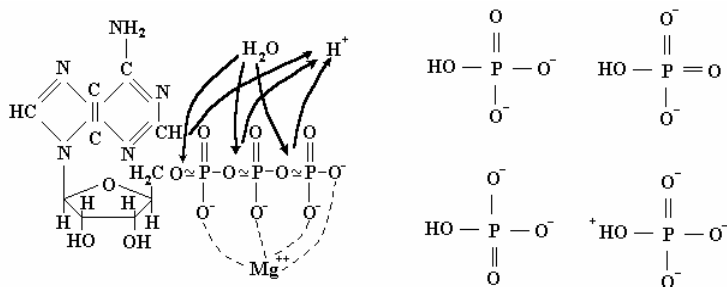


Рис. 3.2. Слева – структура молекулы АТФ. Знаками ~ обозначены макроэргические связи. Жирными стрелками показаны места присоединения молекул воды и отщепления ионов водорода при реакции гидролиза. Пунктиром указаны места координирования ионов Mg^{++} или Mn^{++} . Справа – возможные *резонансные* формы фосфатного иона в водном растворе, отвечающие за 4 кратное вырождение диссоциированного состояния

Принято считать, что относительно высокое значение макроэрга в АТФ и АДФ обусловлено двумя физическими факторами: множественностью форм ортофосфата в воде и электростатическим отталкиванием фосфатных групп в исходных молекулах. Действительно, заряды в ионе HPO_4^{2-} могут быть распределены по атомам кислорода четырьмя разными способами. Это увеличивает вероятность диссоциированного состояния, а с нею и сродство реакции гидролиза. Этот выигрыш нетрудно оценить (см. формулу 2.58): при температуре 37 °C

$$\Delta A = RT \cdot \ln 4 = 0,86 \text{ кк/М или } 0,037 \text{ эв.} \quad (3.3)$$

Это немногим более 10% от величины макроэрга.

Второй фактор более значителен. Об этом говорит тот факт, что при гидролизе последней фосфатной группы в АМФ, когда вклад электростатических сил значительно снижен, изменение свободной энергии снижается до 3,3 ккал/М.

Можно обозначить и третий фактор. Заряженные частицы сильно поляризуют водную среду. Вокруг каждой частицы диполи воды ориентируются и уменьшают электростатическую энергию частицы, тем в большей степени, чем меньше её размер. При физиологических значениях pH ион АТФ имеет 4 отрицательных заряда, ионы АДФ и Ф 3 и 2 соответственно, размеры иона АДФ и тем более иона Ф меньше, чем размеры иона АТФ. Геометрия ионов сложна, поэтому точный расчёт провести трудно, но грубая оценка показывает, что снижение электростатической энергии ионов АДФ и Ф в сильно полярной среде на несколько процентов больше, чем таковое для ионов АТФ.

Вообще энергия гидролиза зависит от структуры молекулы, от которой фосфатная группа отщепляется. Если для унификации взять воду как общий акцептор для переноса фосфатных групп от различных доноров, то можно построить шкалу потенциала переноса группы, которая позволяет определить энергетическую возможность взаимного переноса фосфатной группы между различными соединениями (таблица 3.1). Из таблицы видно, что спонтанный перенос фосфатной группы при стандартных условиях возможен между соединениями только по направлению сверху вниз. Обратный же перенос энергетически возможен лишь при нестандартной стехиометрии. Например, перенос одной фосфатной группы от глюкозо-1-фосфата на креатин теоретически возможен при гидролизе как минимум двух молекул глюкозо-1-фосфата.

Т а б л и ц а 3.1.

Соединение	Сродство (потенциал переноса), кк/М
Фосфоэнолпируват	14,8
1,3-бисфосфоглицерат	11,8
Ацетилфосфат	10,3
Креатинфосфат	10,3
Пирофосфат	8
АТФ	7,3
АДФ	7,3
Глюкозо-1-фосфат	5,0
Глюкозо-6-фосфат	3,3
АМФ	3,3

3.3. Источники энергии для образования АТФ в клетке

Общая схема извлечения энергии из топливных субстратов хорошо известна. У гетеротрофных организмов она построена по принципу конвергенции (рис. 3.3): энергия различных топливных субстратов постепенно переводится на общий носитель – ацетил-коэнзим А (ацетил-СоА).

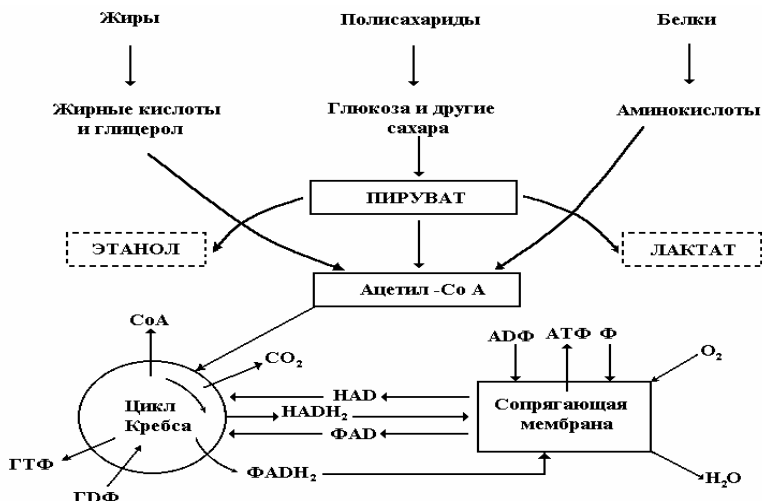


Рис. 3.3. Схема метаболизма топливных субстратов. Стрелками показаны направления химических превращений. На схеме приведены лишь основные метаболиты. НАДН₂ и НАД – восстановленная и окисленная формы никотинамидного переносчика, ФАДН₂ и ФАД – аналогичные формы флавинового переносчика.

Весь процесс можно разделить на три стадии. Первая стадия носит подготовительный характер, она переводит сложные соединения в более простые и не связана с извлечением энергии. Вторая, продолжая катаболизм, сводит разнообразные продукты первой стадии к ацетильной части ацетил-СoА. Здесь в виде высокого восстановительного потенциала ацетил-СoА сосредоточивается основная часть химической энергии исходных субстратов. В центральной ветви этой схемы, а именно в метаболизме сахаров, вторая стадия заключается в разложении шести углеродной молекулы глюкозы на две молекулы трехуглеродного углевода пирувата. Эта реакция, именуемая *гликолизом*, приводит к окислению некоторых промежуточных продуктов разложения глюкозы, но не требует кислорода. Она проходит с участием других окислителей – широко распространённых в клетке никотинамидных переносчиков редокс-потенциала – НАД (восстановленная форма: НАДН₂). Об их свойствах будет рассказано позже. В результате превращения одной молекулы глюкозы в две молекулы пирувата 2 молекулы НАД восстанавливаются до НАДН₂ и 2 молекулы

АДФ фосфорилируются до АТФ. Эти процессы происходят в цитозоле клетки, а их участники не связаны с какими-либо клеточными структурами. Процесс синтеза АТФ в таких условиях получил название **субстратного фосфорилирования**. В частности, синтез первой молекулы АТФ катализируется ферментом *глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназой*, который сопрягает окисление глицеральдегида (и восстановление НАД до НАДН₂) с захватом дополнительной фосфатной группы из раствора на сульфгидридную группу цистеинового остатка своего активного центра. Размещение фосфата в высокоэнергичном положении фермента оказывается возможным за счёт того, что часть энергии окисления глицеральдегида фермент использует для перемещения зарядов в фермент-субстратном комплексе, облегчающем реакцию переноса фосфатной группы. Образовавшийся продукт – 1,3-бисфосфоглицерат (1,3-БФГ) – имеет высокий потенциал переноса второй фосфатной группы и способен уже самопроизвольно передать её на АДФ. Этот процесс катализируется другим ферментом: *фосфоглицераткиназой*. Описанный процесс является примером передачи энтальпии самопроизвольной реакции окисления, при которой окислительно-восстановительные продукты находятся в различных частях одного молекулярного комплекса, в энтальпию *энергетически невыгодной* реакции другого типа (переноса фосфатной группы) в том же комплексе. Вторая молекула АТФ образуется также в процессе субстратного фосфорилирования, но не за счёт окисления, а в результате дегидратации под действием фермента *энлазы*. Это также повышает потенциал переноса фосфатной группы в образовавшемся фосфоэнолпирувате (см. таблицу 3.1). Дальнейший перенос фосфата на АДФ имеет уже положительное сродство и ускоряется ферментом *пируваткиназой* (рис. 3.4).

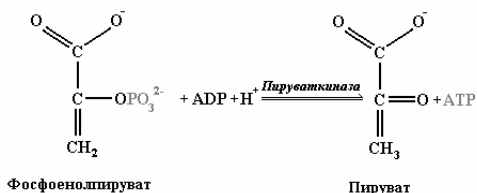
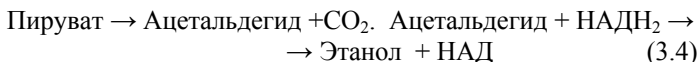


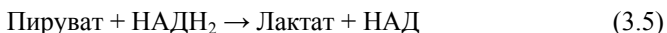
Рис. 3.4. Реакция субстратного фосфорилирования с образованием пирувата

Механизмы субстратного фосфорилирования являются классическими примерами термодинамического сопряжения и достаточно хорошо изучены в биохимии.

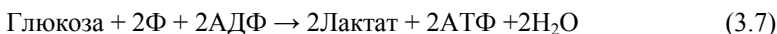
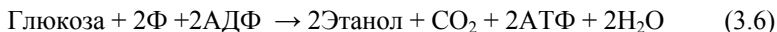
В анаэробных условиях, или в условия выраженной гипоксии, пируват становится центром бифуркации процесса (см. рис. 3). При наличии в клетке фермента *алкогольдегидрогеназы* (как в клетках дрожжей) пируват может превратиться в этиловый спирт (этанол):



В отличие от этого в клетках животных и в микроорганизмах в подобных условиях пируват превращается в молочную кислоту (лактат):



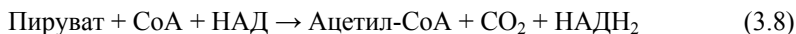
Реакция контролируется ферментом *лактатдегидрогеназой*. В организме животных молочная кислота через некоторое время превращается снова в глюкозу. Если организм совершал большую мышечную работу без достаточного обеспечения мышечной ткани кислородом, то концентрация молочной кислоты в мышцах может некоторое время оставаться на высоком уровне. Это является одной из причин мышечной боли. Закисление внутриклеточной среды (уменьшение рН) при этом является важным сигналом для клетки о степени её функциональной нагрузки. При достаточно большом закислении цитоплазмы начинается активация генома и увеличивается синтез недостающих структурных и регуляторных белков – важные приспособительные (*адаптационные*) процессы. Реакции (3.4) и (3.5) получили название *спиртового* и *молочнокислого* брожения. Обе эти реакции требуют для получения более восстановленного продукта переносчика восстановленного потенциала. Им является НАДН₂, полученный на предшествующих стадиях гликолиза. Общая стехиометрия этих двух типов гликолиза выглядит следующим образом:



Никотинамидные переносчики редокс-потенциала не вошли в эти итоговые уравнения, т.к. их участие носит промежуточный цикличе-

ский характер. Важно отметить, что биоэнергетический выход этих реакций ограничивается *двумя молекулами АТФ* на одну использованную молекулу глюкозы. Это совсем немного, около 2% от исходной химической энергии глюкозы. Правда, продукты этого превращения (этанол и лактат) имеют ещё большой запас энергии, но для её извлечения нужны дополнительные механизмы.

При нормальной концентрации кислорода происходит утилизация ацетил-СоА и открывается новый широкий дополнительный канал убыли пирувата из-за его превращения в ацетил-СоА. Это третья стадия метаболизма. Она начинается с окисления пирувата до ацетил-коэнзима-А. Простая структура молекулы пирувата (рис. 3.4) обладает большим запасом химической энергии. Её вполне достаточно для восстановления молекулы НАД за счёт окисления своей карбоксильной группы до CO_2 и перенесения оставшейся ацетильной группы ($\text{O} = \text{C} - \text{CH}_3$), обладающей также высоким восстановительным потенциалом, на коэнзим-А. Формула этой реакции выглядит просто (рис. 3.6):



Однако высокое химическое сродство этой реакции сталкивается с её сильной кинетической затруднённостью из-за того, что её отдельные этапы тормозятся высокими энергетическими барьерами. Поэтому реально процесс (3.8) очень сложен, включает четыре стадии и использует три различных фермента, образующих пируват-дегидрогеназный комплекс. Мы оставим в стороне этот биохимический аспект проблемы и отметим только, что СоА – это сложное органическое соединение, которое способно присоединять ацетильную группу через тиоэфирную связь (рис. 3.5).

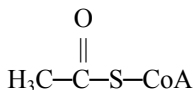


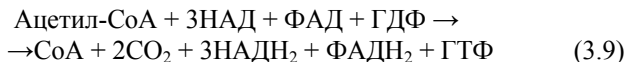
Рис. 3.5. Сокращённая структура ацетил-СоА.

Использование высокого восстановительного потенциала ацетил-СоА происходит на последующем этапе его ступенчатого окисления до CO_2 и СоА в цикле трикарбоновых кислот (иначе, цикле лимонной кислоты), называемом также *циклом Кребса*. Освободив-

шийся CoA вновь восстанавливается пируватом до ацетил-CoA, и цикл повторяется. В результате окисления молекул ацетил-CoA восстанавливаются подвижные переносчики электронов НАД и ФАД, фосфорилируются молекулы гуанидиндифосфата (ГДФ) – аналоги молекул АДФ – до ГТФ (аналогов АТФ) и выделяется CO₂. Окисление ацетил-CoA – также бескислородный процесс, но он возможен только в аэробных условиях, так как восстановленные продукты этого цикла НАДН₂ и ФАДН₂ регенерируются и обеспечивают непрерывную работу цикла только в присутствии кислорода. Окисление этих переносчиков происходит на заключительном этапе третьей стадии с непосредственным участием молекулярного кислорода в качестве терминального акцептора электронов. Химическими продуктами этого этапа являются вода и молекулы АТФ, полученные посредством фосфорилирования АДФ, а также НАД и ФАД, после окисления НАДН₂ и ФАДН₂. НАД и ФАД возвращаются на предыдущие этапы процесса окисления глюкозы, обеспечивая непрерывность процесса в целом.

Третья стадия – образование ацетил-CoA из пирувата и жирных кислот, а также его дальнейшие превращения – протекает внутри клеточных органелл (митохондрий). Ферменты, ведущие реакции этой стадии, локализованы в тонкой сильно складчатой мембране, отделяющей внутренность митохондрии (матрикс) от цитоплазмы клетки и называемой *сопрягающей*. У бактерий, не имеющих митохондрий, сопрягающая мембрана охватывает весь объём клетки и располагается непосредственно под наружной оболочкой бактерии.

Итоговая стехиометрия цикла Кребса такова:



В свою очередь на заключительном этапе окислительного фосфорилирования в митохондриях на каждую молекулу окисляемого НАДН₂ образуется 3 молекулы АТФ, а на каждую молекулу ФАДН₂ – 2 молекулы АТФ.

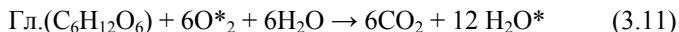
Теперь можно подсчитать полный энергетический баланс окислительного фосфорилирования в клетке. В процессе гидролиза одной молекулы глюкозы до двух молекул пирувата в цитозоле образуется 2 молекулы АТФ и 2 молекулы НАДН₂. При превращении 2 молекул пирувата в 2 молекулы ацетил-CoA в митохондриях образуется ещё 2 молекулы НАДН₂. Цикл Кребса также в митохондриях, окисляя 2 молекулы ацетил-CoA, производит 2 молекулы ГТФ, 2 молекулы ФАДН₂ и 6 молекул НАДН₂. Окисление всех 10 молекул

НАДН₂ на мембранах митохондрий даёт 30 молекул АТФ, ещё 4 молекулы добавляет мембранное окисление 2 молекул ФАДН₂. Добавляя к этому 2 молекулы АТФ от цитозольной стадии гликолиза и учитывая энергетическую эквивалентность ГТФ и АТФ, получим в итоге энергию, эквивалентную **38** молекулам АТФ. Правда, мы включили в число окисляемых молекул 2 молекулы НАДН₂, образовавшиеся вне митохондрий. Внешняя мембрана митохондрий непроницаема для НАДН₂. Однако в клетках печени и сердца существует так называемый *малатный механизм* передачи восстановительного потенциала наружных молекул НАДН₂ на внутренние без потери. И наш подсчёт справедлив. В некоторых других клетках (например, летательных мышцах насекомых) используется не столь совершенный механизм передачи потенциала (его называют *глицерофосфатным челноком*), при котором восстановительный потенциал цитозольного НАДН₂ снижается до потенциала ФАДН₂ в митохондриях. Это приводит к снижению общего энергетического выхода на 2 молекулы АТФ.

Теперь легко сделать оценку коэффициента преобразования энthalпии глюкозы в энthalпию АТФ:

$$\eta = 38 \times 7,3/686 = 0,4. \quad (3.10)$$

Это значительно больше, чем 2%, полученные на этапе гликолиза. Но при реальных условиях, когда активности участников отличаются от стандартных, при подсчёте эффективности преобразования свободной энергии к энthalпийному члену необходимо добавлять энтропийный (формула 2.58), и результат может быть ещё больше. Прделаем в качестве упражнения такой расчёт, используя типичные значения активностей для клеток печени: [Гл.] = 5 mM, [АТФ] = 3,5 mM, [АДФ] = 1,5 mM, [Ф] = 5 mM, [O₂] = 0,1 атм, [CO₂] = 0,06 атм. Уравнение полного окисления глюкозы: и синтеза АТФ:



Знак * напоминает, что кислород, поглощаемый при дыхании, входит в состав выделяемой воды, а не в CO₂, как иногда думают. Соответствующие изменения свободной энергии в ккал на моль глюкозы:

$$A_{\text{гл}} = 686 + RT \cdot \ln \{ [\text{Гл.}] \cdot [\text{O}_2]^6 / [\text{CO}_2]^6 \} = 686 + 1,42 \cdot \lg \{ 5 \cdot 10^{-3} \cdot (0,1/0,06)^6 \} = 685 \text{ ккал/М} \quad (3.13)$$

$$A_{\text{АТФ}} = -7,3 + RT \cdot \ln \{ [\text{АТФ}] / [\text{АДФ}] \cdot [\text{Ф}] \} = -7,3 - 1,42 \cdot \lg 3,5 \cdot 10^{-3} / 1,5 \cdot 10^{-3} \cdot 5 \cdot 10^{-3} = -11,4 \text{ ккал/М} \quad (3.14)$$

Здесь мы учли, что натуральный логарифм в 2,3 раза больше, чем десятичный, а множитель RT перед логарифмом при температуре 310 К (т. е. 37 °С) равен 0,615 ккал/М. Теперь для коэффициента преобразования получим.

$$\eta = 38 \cdot 11,4 / 685 = 0,63, \text{ или } 63\% \quad (3.15)$$

Это очень впечатляющая величина.

3.4. Окислительно-восстановительный потенциал

В предыдущих разделах мы использовали представление об окислительно-восстановительных (*редокс*) процессах. Как и для всяких химических превращений направление и скорость редокс-реакции определяется её химическим средством. Как уже упоминалось, общим признаком редокс-процессов является перенос электронов между реагентами, который приводит к окислению донора и восстановлению акцептора. По международной конвенции (Стокгольм, 1953 год) общее уравнение редокс-реакции записывается так:



т. е. за положительное направление процесса принято восстановление акцептора Ox с образованием окисленного донора Red^{z-} в качестве продукта реакции. При этом отрицательный заряд продукта не следует воспринимать буквально: это обозначает лишь *относительное* увеличение его электронного заряда. По определению (2.58) средство этой реакции:

$$A = A_0 + RT \cdot \ln [\text{Ox}] / [\text{Red}^{z-}]. \quad (3.17)$$

Общий вид редокс-реакций (3.16) позволяет выразить средство через удобную общую величину: окислительно-восстановительный (редокс) потенциал E , приняв по определению:

$$E = A/ZF + E^0 = A_0/ZF + RT/ZF \cdot \ln [Ox]/[Red^z] = \\ = E_0 + kT/Ze \cdot \ln [Ox]/[Red^z] \quad (3.18)$$

Здесь E_0 – значение потенциала при стандартных условиях. Редокс-потенциал принято выражать в вольтах. В соответствии с определением (3.18) его величина тем более положительна, чем более положительна величина A , т. е. чем больше стремление реакции (3.16) идти направо. Это создаёт удобное качественное правило: чем более положительным потенциалом обладает редокс-пара, тем она более привлекательна для электронов, как будто некий электрод притягивает переносимые электроны.

Рассмотрим это на важном примере. Редокс-потенциал пары протон–водород, связанной уравнением реакции:



имеет значение:

$$E_{H^+/H_2} = E_{0\ H^+/H_2} + (RT/2F) \cdot \ln [H^+]^2/[H_2] \quad (3.20)$$

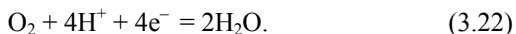
Переходя к десятичным логарифмам и учитывая, что $-\lg [H^+]$ это – pH среды, а активность газообразного водорода, это – его парциальное давление в атмосферах, получим из (3.20) при температуре 37 °C:

$$E_{H^+/H_2} = E_{0\ H^+/H_2} - 0,060 \cdot pH - 0,03 \cdot \lg P_{H_2} \quad B. \quad (3.21)$$

При стандартных условиях, когда активность ионов водорода равна единице, а парциальное давление H_2 – одна атмосфера, это даёт: $E_{H^+/H_2} = E_{0\ H^+/H_2}$. Международная конвенция рекомендует все окислительно-восстановительные потенциалы отсчитывать от этого значения. Это создаёт **водородную шкалу редокс-потенциалов**, в которой стандартный потенциал пары ион водорода–водород при всех температурах равен нулю. Стандартные условия для этой пары реализуются на так называемом *водородном электроде*. Он представляет чернёную платину, обдуваемую водородом при атмосферном давлении и помещённую в раствор кислоты с pH = 0. В таком устройстве устанавливается равновесное распределение электронов между H^+ , H_2 и металлической Pt. Этот электрод используется как эталон для калибровки других, более практичных электродов, например, широко используемого в экспериментах одноноrmального хлорсеребряного электрода

(Cl^-/AgCl , Ag; $E_0 = 0,222$ В) или насыщенного каломельного ($\text{Cl}^-/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$, Hg; $E_0 = 0,241$ В). При нейтральном значении pH потенциал водородного электрода сдвигается в соответствии с формулой (3.21) до значения $-0,41$ при комнатной температуре.

Другая важная редокс-пара – это кислород-вода:



Стандартный потенциал её равен $+1,23$ В. При нейтральной кислотности ($\text{pH} = 7$) потенциал кислородной пары сдвигается до значения $+0,82$ В. В соответствии с приведенным правилом для редокс-потенциалов сродство электронов к кислороду больше, чем к водороду на $1,23$ эВ при стандартных условиях. Это означает энергетическую выгодность перехода электронов от водорода к кислороду в полном согласии с известной из химии электроотрицательностью кислорода. Полезно отметить, что величины потенциалов водородной и кислородной пары изменяются при изменении pH, но алгебраическая разница между ними составляет $1,23$ В и не зависит от pH. На этом интервале значений расположены стандартные редокс-потенциалы подавляющего большинства участников окислительно-восстановительных процессов в клетке. Примеры приведены в таблице 2, в которой стандартные потенциалы пар указаны по водородной шкале, сдвинутой к нейтральному значению pH, характерному для живой клетки

Спонтанный перенос электронов между двумя редокс-парами в стандартных условиях может происходить только в направлении редокс-потенциалов сверху вниз по таблице. Обратный перенос требует дополнительного источника свободной энергии. При специально устроенном контакте двух пар термодинамический потенциал переноса может быть реализован в виде *электродвижущей силы гальванического элемента*. Например, пары Zn/Zn^{++} и Cu^{++}/Cu образуют элемент Даниеля с ЭДС $1,1$ В. Пары, выходящие вверх за интервал между водородной и кислородной парами, являются сильными восстановителями. Пары внизу таблицы являются сильными окислителями и опасны для метаболизма клетки. Такие элементы, как Ag^+ и Pt^{++} проявляют бактерицидные свойства, а Cl_2 и F_2 известны как сильные яды.

При окислительно-восстановительных превращениях сложных соединений изменения в их структуре могут затрагивать лишь малую их часть, играющую роль активного центра. Из рисунков 3.6 и 3.7 видно, что изменения касаются только состояния части гетероцик-

лов в ФМН и фенольного кольца в Q_{10} и не затрагивают остальную часть этих больших молекул.

Т а б л и ц а 2.

Донор	Акцептор	Z	Редокс-потенциалы при pH 7, вольты
Zn	Zn^{++}	2	-0,76
Ацетальдегид	Альдегид	2	-0,60
Пируват + CoA	Ацетил-CoA	2	-0,48
Ферродоксин	Ферредоксин	2	-0,43
H_2	$2H^+$	2	-0,42
НАДФ· H_2	НАДФ	2	-0,42
НАД· H_2	НАД	2	-0,32
ФМН· H_2	ФМН	2	-0,30
ФАД· H_2	ФАД	2	-0,23
Этанол	Ацетальдегид	2	-0,20
Лактат	Пируват	2	-0,19
Убихинон восстановленный	Убихинон окисленный	2	+0,04
Цитохром v^{2+}	Цитохром v^{3+}	1	+0,07
Аскорбат	Дегидроаскорбат	2	+0,075
CoQ	CoQ^{++}	2	+0,12
H_2S	S	2	+0,17
Цитохром a^{2+-}	Цитохром a^{3+}	1	+0,28
Cu	Cu^{++}	2	+0,34
Цитохром a_3^{2+}	Цитохром a_3^{3+}	1	+0,55
Fe^{++}	Fe^{+++}	1	+0,77
Ag	Ag^+	1	+0,8
$2 \cdot H_2O$	O_2	4	+0,81
Pt	Pt^{++}	2	+1,2
$2Cl^-$	Cl_2	2	+1,36
$2F^-$	F_2	2	+2,87

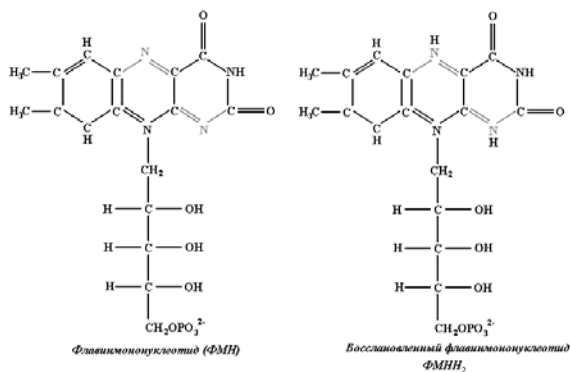


Рис. 3.6. Изменения в структуре флавимононуклеотида при его восстановлении. Слева -- окисленная, справа – восстановленная формы.

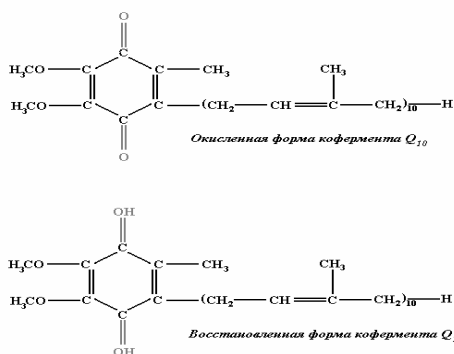


Рис. 3.7. Изменения в коферменте Q₁₀ в ходе окислительно-восстановительной реакции. Вверху – окисленная, внизу – восстановленная формы

В свою очередь изменения в остальной части молекул или другие факторы, изменяющие окружение активного центра, могут изменять значение стандартного редокс-потенциала. Это важное обстоятельство может использоваться клеткой для управления потоками электронов.

В живой клетке реальный перенос восстановительных эквивалентов может осуществляться различными способами:

- посредством передачи электронов, иногда сразу по два (или по четыре), как в случаях с цитохромами или металлами переменной валентности,
- переносом атомов водорода, иногда парами, как при превращениях хинонов (убихинон, CoQ) и рибофлавинов (ФАД и ФМН),
- передачей гидрид иона (:H^-), как при превращениях $\text{НАДН}_2 \leftrightarrow \text{НАД}$, которые мы для краткости обозначаем как перенос 2 атомов водорода, а на самом деле эта реакция двухэлектронного восстановления выглядит так:



Ион водорода не входит непосредственно в восстановленную молекулу, а «болтается» в растворе около неё;

- прямым взаимодействием субстрата с кислородом и внутримолекулярным перемещением электрона, как например, при окислении углеводорода до спирта:



Для того чтобы использовать окислительно-восстановительные потенциалы реагентов для анализа возможности протекания тех или иных редокс-процессов нужно знать не только стандартные потенциалы участников, но и их реальные значения. Как и химическое сродство любой химической реакции, реальный редокс-потенциал содержит помимо энтальпийного члена, E_0 , ещё энтропийный (второй в выражении (3.18)), зависящий от активности участников процесса. Только их сумма определяет реальные значения редокс-потенциалов. А активности участников метаболизма часто значительно отличаются от стандартных значений, они непостоянны и зависят от состояния клетки в данный момент. В свою очередь соотношение активностей восстановленных и окисленных субстратов внутри каждой редокс-пары зависит от того редокс-потенциала, который имеет данный элемент объёма клетки. Живая клетка – сильно неравновесная система и, вообще говоря, отдельные её части, тем более отдельные её компартменты, могут не успевать приходить в электрохимическое равновесие между собой.

Равновесное соотношение активностей восстановленной и окисленной форм метаболита при том значении редокс-потенциала, которое характеризует рассматриваемую часть клетки, можно найти из соотношения (3.18). Пусть доля активности окисленной формы веще-

ства в общей активности $a_{ox}/a = x$, тогда доля восстановленной - $a_{red}/a = 1 - x$. Подставим это в формулу (3.18):

$$E = E_0 + (RT/zF) \cdot \ln x / (1 - x) \rightarrow E - E_0 = (kT/ze) \cdot \ln x / (1 - x) \rightarrow x / (1 - x) = \exp[(E - E_0)ze/kT] \rightarrow x = \exp[(E - E_0)ze/kT] / \{1 + \exp[(E - E_0)ze/kT]\}$$

График этого решения показан на рис. 3.8.

Рис. 3.8. Зависимость доли окисленной формы реагента от редокс-потенциала среды.

Это – не что иное, как *распределение Ферми*. E_0 – энергия Ферми, и $x(E_0) = 0,5$, т. е. окисленные и восстановленные формы реагента находятся в равновесии. При $E \rightarrow +\infty$ доля окисленной формы асимптотически приближается к 1.

В живой клетке все участники окислительно-восстановительных реакций находятся в состоянии постоянного взаимного обмена восстановительными эквивалентами, в котором задействованы все указанные типы обмена. При этом в каждом месте устанавливается некий средний взвешенный редокс-потенциал среды, который и определяет преимущественное направление реакций. Если в клетку поступают извне восстановленные соединения (пищевые субстраты), то средний редокс-потенциал её поднимается (в сторону отрицательных значений), и поток восстановительных эквивалентов направляется преимущественно на восстановление тех участников, которые в текущем состоянии окислены, в том числе и относительно высоко лежащих, ведущих к запасанию энергии. При поступлении в клетку окислителя (кислорода) увеличивается доля глубоко окисленных состояний, средний редокс-потенциал клетки опускается и электронные потоки перераспределяются в сторону более полного окисления пищевых субстратов. Таким образом, средний редокс-потенциал клетки оказывается важным управляющим параметром, изменяющим вклад различных энергетических механизмов в зависимости от текущей ситуации. При этом автоматически согласуются процессы запасания и использования энергии.

Обобщая вышесказанное, можно заключить, что, выбрав в качестве основного источника свободной энергии химическую энергию окислительно-восстановительных процессов, живая природа не только получила надёжный и универсальный источник энергии, но и

удобный инструмент саморегуляции элементарных биоэнергетических процессов.

3.5. Механизм сопряжения окисления и фосфорилирования

Удачный выбор источника химической энергии ещё не достаточен для обеспечения энергетических потребностей всех внутриклеточных процессов. Необходим столь же удачный выбор *способа* и *инструментария* преобразования энергии окислительно-восстановительных реакций в энергию, удобную для использования в разнообразных элементарных процессах. То, что фосфатные макроэргии в АТФ и АДФ играют основную роль в этом распределении энергии, стало общепринятым ещё в середине XX века. Но *как* окисление глюкозы предаёт высвобождаемую энергию в эти макроэргии? Химический механизм сопряжения первых этапов гликолиза с фосфорилированием описан в предыдущем разделе. А каков механизм заключительной стадии окисления НАДН, обеспечивающей основной выход АТФ? Ответ на этот вопрос очень важен не только для биологии, но и для физики. Ведь коэффициент преобразования энергии в митохондриях, как мы видели, значительно превосходит тот, который характерен для известных технических устройств.

В начале исследования этого механизма выдвигаемые гипотезы формировались в две группы: химическую и конформационную.

Сторонники **химической гипотезы**, к которым относилось подавляющее число исследователей, отталкивались от прецедента субстратного фосфорилирования, которое реализуется на предварительных стадиях гликолиза и кратко описано в предыдущем разделе. Это обычная ферментативная реакция между водорастворимыми субстратами. Почему бы подобным реакциям не идти в митохондриях? Однако все попытки зарегистрировать синтез АТФ в пробирке, содержащей Ф, АДФ, НАДН₂, О₂ и все другие возможные участники процесса, выделенные из митохондрий, оканчивались неудачей. Не были также найдены какие-либо высокоэнергичные продукты, которые можно было бы рассматривать как промежуточные переносчики макроэрга. Некоторым участникам этих событий изменяло терпение, и они шли на подтасовки экспериментальных результатов. Уж очень хотелось оказаться первым у финиша этой престижной гонки.

Конформационная гипотеза опиралась на представление о том, что процесс окисления НАДН может привести к формированию локальных напряжений внутренней мембраны митохондрий, запаасающих часть энергии, выделяемой в процессе окисления. Затем,

возвращаясь к исходному состоянию, мембрана подобно расправляющейся пружине может передать свободную энергию участникам реакции фосфорилирования. Такие изменения структуры митохондриальной мембраны могли бы быть опосредованы, например, каким-либо мембранно-связанным белком. Возможность такого конформационного процесса мы уже обсуждали. Эту гипотезу долго разрабатывала немногочисленная группа биохимиков (П. Бойер), но обнаруживаемые конформационные изменения в мембране при окислении субстратов не были достаточно быстрыми для того, чтобы их можно было считать факторами, сопрягающими окисление и фосфорилирование.

На фоне неудач обеих гипотез появилась альтернативная гипотеза, получившая название **хемиосмотической**. В 1961 году английский биохимик П. Митчел высказал предположение, что для сопряжения окисления НАДН₂ с синтезом АТФ из АДФ и Ф необходима целостность внутренней мембраны митохондрий, т. е. она должна чётко отделять внутреннее пространство митохондрии («матрикс») от цитоплазмы клетки. Это была качественно новая идея. То, что многие ферменты в клетке нормально функционируют только в тесном контакте с мембраной или даже встроены внутрь мембраны, было известно, но топология мембранной системы никогда не считалась важной для протекания биохимических реакций. Гипотеза П. Митчела подчёркивала важность пространственного разделения продуктов окисления и возникновения при этом трансмембранного электрического и концентрационного потенциала. Этот электрохимический потенциал мог бы выступить в качестве промежуточного энергетического фактора, сопрягающего окисление с последующим фосфорилированием.

В сущности П. Митчел впервые предложил рассматривать биохимический реактор как *физическую систему*. Эта красивая идея оказалась слишком новой и первоначально не была воспринята биохимиками, продолжавшими следовать двум предыдущим гипотезам. Хемиосмотическая гипотеза оставалась практически незамеченной до тех пор, пока сам Митчел, вынужденный по состоянию здоровья на время прекратить научную работу и окунуться в деревенскую жизнь, не возобновил свои исследования и не показал простыми измерениями, выполненными в скромных сельских условиях, что его гипотеза имеет право на существование и не только хорошо объясняет известные факты, но и обладает высокой предсказательной силой. После возникшей многолетней острой дискуссии гипотеза привлекла многих сторонников и стимулировала обширные исследования во многих ла-

бораториях. Через несколько лет, получив подтверждение основных своих позиций, она в 1978 году была отмечена Нобелевской премией. Несколько упрощая, суть гипотезы Митчела можно выразить следующей схемой (рис. 3.9).

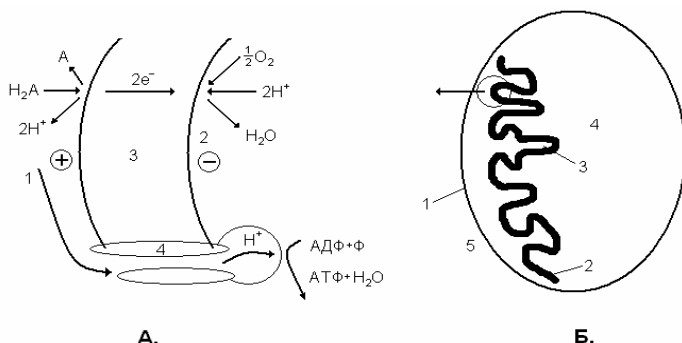


Рис. 3.9. А – Схема окислительно-восстановительного процесса и возникновения электрохимического потенциала на сопрягающей мембране: 1 – цитоплазма, 2 – матрикс, 3 – сопрягающая мембрана, 4 – АТФ-синтаза. Б – условный вид сечения митохондрии: 1 – наружная перфорированная мембрана, 2 – внутренняя сопрягающая мембрана, 3 – складки внутренней мембраны (кристы), 4 – матрикс, 5 – цитоплазма клетки. Участок мембраны, приведенный на левом рисунке, указан кружком на правом

Восстановленный переносчик редокс- потенциала (типа НАДН, ФАДН, восстановленного цитохрома с), обозначенный как AH_2 , при окислении на внешней стороне мембраны отдаёт свои электроны в цепь переноса электронов и освобождает у внешней грани мембраны 2 иона H^+ . Цепь переноса электронов включает локализованные в мембране подвижные переносчики (типа хинонов, растворимых в липидах) и неподвижные белки (типа цитохромов) с различными значениями редокс-потенциалов. Цепь переносит электроны по градиенту редокс- потенциалов к конечному акцептору- кислороду у противоположной грани мембраны. Это спонтанный термодинамически выгодный процесс. Мембрана в нормальном состоянии не проницаема для протонов. В результате на сопрягающей мембране образуется транс-мембранный электрохимический потенциал ψ , состоящий из двух частей: электрического потенциала ϕ (– внутри, + снаружи) и кон-

центрационного потенциала протонов ($[H^+]$ – больше снаружи и меньше внутри):

$$\Psi = \varphi + RT/F \ln [H]_e/[H]_i = \varphi + 2,3 \cdot RT/F \cdot \lg [H]_e/[H]_i = \varphi - 0,06 \cdot \Delta pH \quad (3.25) \\ \text{при } T = 37^\circ \text{ C.}$$

Здесь ΔpH – это разность показателей кислотности цитоплазмы и матрикса. Изменение кислотности, соответствующее этой гипотезе, означает закисление цитоплазмы и защелачивание матрикса.

Электрохимический потенциал является мерой потенциальной энергии протонов, полученной за счёт разделения мембраной продуктов процесса окисления AN_2 и «векторного», т. е. направленного в пространстве переноса зарядов. Время, в течение которого эта энергия может сохраняться, лимитируется изоляционными свойствами мембраны. Главным элементом «утечки» протонов сквозь мембрану является трансмембранный протонный канал в ферменте АТФ-азе, способном вести синтез АТФ за счёт энергии протонного потока. Однако если есть конкурирующий канал утечки электрического или концентрационного потенциала, то диссипация энергии может сделать невозможной синтез АТФ, т. е. может произойти *разобщение* окисления и фосфорилирования.

Не останавливаясь подробно на интересной и поучительной истории развития хемиосмотической теории, приведём кратко основные экспериментальные факты, свидетельствующие в её пользу.

Первое важнейшее свидетельство было получено самим Митчелом. Измеряя pH суспензии интактных (целых!) митохондрий в пробирке при внесении в неё субстратов окисления, он легко обнаружил закисление среды инкубации, которая заменяла цитоплазму клетки в этом опыте *in vitro*. Правда, здесь Митчелу сильно повезло. Он использовал воду, не очищенную от ионов Ca^{++} . А мембрана митохондрий легко проницаема для них. Электрический потенциал мембраны (+ снаружи!) увлекал ионы кальция внутрь, частично уменьшая заряд мембраны, а с ним и величину φ . Это снимало препятствие при окислении субстрата для дальнейшего протекания электронного тока внутрь и освобождения протонов снаружи мембраны и сдвигало равновесие в сторону увеличения стационарного значения ΔpH . При отсутствии ионов Ca^{++} в используемой воде сдвиг кислотности становится слишком маленьким для регистрации его простым pH-метром, которым пользовался Митчел. Так химическая небрежность Митчела помогла ему в первом же эксперименте сразу получить важный результат в пользу своей гипотезы. А, разобравшись с ролью ионов

кальция, он получил также свидетельства о возникновении электрического потенциала на мембране, предсказанное его гипотезой. В дальнейшем при необходимости компенсации электрического потенциала или управления им стали пользоваться введением в среду ионов K^+ и искусственным переносчиком их через мембрану – антибиотиком валиномицином. Эти опыты, а также опыты с использованием синтетических ионов разного знака, полностью подтвердили возникновение на мембране и концентрационного протонного потенциала, и электрического потенциала предсказанной Митчелом полярности.

Возникновение на сопрягающей мембране электрического потенциала было подтверждено также с помощью потенциалочувствительных флуоресцентных меток и измерением электрохромного эффекта в оптических спектрах поглощения компонентов мембраны, обусловленного эффектом Штарк (Х. Витт).

Второе важнейшее следствие из гипотезы Митчелла – это естественное объяснение механизма действия так называемых *разобшителей*. Это большой класс химических соединений разнообразной природы, способных блокировать синтез АТФ при нормально протекающем окислении обычных субстратов. Митчел предположил, что блокирующее действие разобшителей состоит в том, что они делают мембрану проницаемой для протонов. При этом протонный потенциал расходуется на создание «тока короткого замыкания», и АТФ-азная синтезирующая машина обесточивается. Многочисленные эксперименты с природными и синтетическими мембранами подтвердили эту версию. Теперь разобшающую способность любого вещества можно определить в простом эксперименте по его способности увеличивать протонную проводимость фосфолипидной мембраны.

Естественное объяснение в рамках хемиосмотической гипотезы получил и известный феномен холодового разобщения окисления и фосфорилирования. Он состоит в том, что у теплокровных организмов наряду с «дрожательным» термогенезом, т. е. выделением тепла в ответ на охлаждение за счёт бесполезной диссипации энергии гидролиза АТФ при мышечной дрожи, есть другой механизм разогрева за счёт прямого выделения тепла при протекании окисления с отключённым фосфорилированием. Оказалось, что в митохондриях клеток бурого жира, которые как радиаторы окутывают кровеносные сосуды, ведущие в головной мозг, содержится особый белок – термогенин, способный в своей активной форме переключать дыхание на холостой ход и превращать протонный потенциал сопрягающей мембраны в обычное джоулево тепло. Активатором термогенина являются жирные кислоты, которые образуются из бурого жира с помощью фер-

мента липазы. Бурый жир является одновременно и дополнительным субстратом окисления. Липаза же активируется в свою очередь цепочкой процессов, включаемой гормоном норадреналином. А появление в крови норадреналина является ответным сигналом организма на срабатывание холодовых рецепторов кожи. Этот механизм внутреннего подогрева тканей организма и в первую очередь крови, омывающей головной мозг, очень эффективен: 1 кг бурого жира у подготовленного (в результате «закалки») организма способен обеспечить мощность тепловыделения около 400 Вт. Этот механизм стал понятен с позиций хемоосмотической гипотезы.

Сопрягающая роль электрохимического потенциала, конвертирующего энергию окисления топливных субстратов, была продемонстрирована рядом опытов, в которых для создания потенциала на мембране был использован альтернативный источник энергии. Так, например, выдерживание суспензии митохондрий в среде с большой концентрацией ионов калия через достаточное время приводит к возрастанию концентрации K^+ в матриксе митохондрий. Этот процесс можно значительно ускорить, добавив в среду антибиотик валиномицин, который встраивается в мембрану и многократно увеличивает трансмембранную проницаемость ионов калия. Если затем перенести митохондрии в безкалийную среду, то ионы K^+ начнут выходить наружу, унося с собой часть положительного электрического заряда матрикса, пока на сопрягающей мембране не установится равновесный для ионов калия нернстовский потенциал. Его полярность (минус внутри) как раз соответствует знаку митчеловского электрохимического потенциала. Оказалось, что при наличии в среде достаточного количества АДФ и Ф эти энергизованные таким необычным способом митохондрии способны вести синтез АТФ безо всякого субстрата окисления (Б. Прессман).

Было установлено также, что в фотосинтетическом аппарате растений мембрана тилакоида (подробнее об этом – позже) является сопрягающей. Аналогичными свойствами обладает и фотосинтетическая мембрана у фотосинтезирующих бактерий, у которых она расположена под наружной клеточной оболочкой. Электрохимический потенциал здесь создаётся за счёт энергии света. Однако и в этом случае источник его создания можно заменить другим. Если выдержать тилакоиды в кислой среде, так чтобы их внутренность закислилась, а потом перенести их в щелочную среду, то на мембране возникнет электрохимический потенциал протонов нужной полярности (фотосинтетическая мембрана вывернута наизнанку относительно мембра-

ны митохондрий). При прочих благоприятных условиях он обеспечивает синтез АТФ без света (А. Ягендорф).

Важное подкрепление гипотезы Митчела было получено в опыте с так называемой химерой (Р. Ракер и К. Стокениус). Был синтезирован искусственный «организм»: в мембрану липосомы (пузырёк в воде), состоящую из фосфолипидов сои, был встроен комплекс АТФ – синтазы из митохондрий сердца быка и светопреобразующий комплекс – бактериородопсин – из соелюбивых бактерий (об этом подробнее – позже). Бактериородопсин является известным протонным фотонасосом, который, находясь в мембране бактерий, под действием света выкачивает ионы водорода из цитоплазмы бактерий наружу. Все три компонента этого устройства являются представителями разных биологических царств: растений, животных и микроорганизмов и никогда не встречались в такой компании. Поэтому их комбинация и получила такое название. Если ориентация компонент в мембране соответствует гипотезе Митчела, то при освещении этого устройства светом и при наличии в липосоме АДФ и P_i в ней синтезируется АТФ.

В 1978 г. П. Митчел за свою гипотезу, которая без преувеличения революционизировала биоэнергетику, был удостоен Нобелевской премии. Но если идея о фундаментальной роли протонного потенциала в сопряжении окисления и фосфорилировании к этому времени была признана большинством исследователей, а механизм образования мембранного потенциала легко объяснился направленным (и при том противоположным) трансмембранным переносом электронов и протонов, то вопрос о *молекулярном механизме* преобразования электрохимической энергии мембраны опять в химическую ещё долго оставался предметом исследования и дискуссий. Представления самого Митчела о возможном механизме фосфорилирования оказались не вполне удачными. Потребовалось ещё много лет для того, чтобы молекулярная модель фосфорилирования получила осязаемые очертания.

Не останавливаясь на истории этих исследований, констатируем сегодняшние представления. Митохондриальная АТФ-аза представляет собой белок, состоящий из двух блоков: условно говоря, ножки F_0 , пронизывающей мембрану, и шляпки F_1 , примыкающей к ножке со стороны матрикса (рис. 3.9.А). Внутри ножки этого «гриба» есть канал, по которому протоны с внешней (цитоплазматической) стороны мембраны под действием электрохимического потенциала устремляются внутрь митохондрии, где встречаются со шляпкой. Под действием «напора» потока протонов в субъединицах шляпки возни-

кают конформационные напряжения, которые заставляют «сердцевину» шляпки вращаться, совершая химическую работу по синтезу АТФ из АДФ и Ф. Схема устройства этого фермента показана на рис. 3.10 более детально.

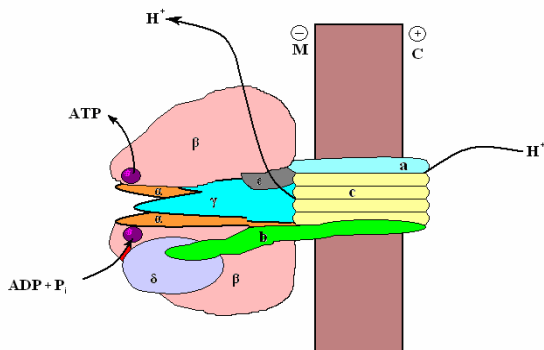


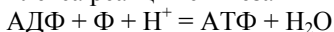
Рис. 3.10. Комплекс F_0 , F_1 АТФ – синтазы. М – матрикс, С – межмембранное пространство, обращённое к цитоплазме. Латинскими буквами обозначены субъединицы комплекса F_0 , греческими – комплекса F_1

Гидрофобный комплекс F_0 содержит 1 субъединицу a , 2 субъединицы b и около 10 мелких субъединиц c . Входной протонный канал, ориентированный в сторону кислого цитоплазматического пространства, находится между субъединицами a и c . В нативной структуре, однако, сквозной проход протона в щелочную область матрикса митохондрии перекрыт элементами комплекса F_1 , и протоны могут продвигаться насквозь лишь при взаимном перемещении субъединиц. Шляпка комплекса F_1 , имеющего гидрофильную поверхность, состоит из 3 α субъединиц, чередующихся с 3 β субъединицами, образуя сфероид диаметром около 10 нм и высотой 8 нм. Этот сфероид в целом неподвижен за счёт связи через субъединицу δ с субъединицей ϵ , сердцевина же шляпки (субъединица γ с регулятором активности комплекса ϵ) способна вращаться вокруг оси, перпендикулярной плоскости мембраны. Однако, выходной протонный канал, обращённый в щелочную среду матрикса, открывается только при наличии всех необходимых субстратов для синтеза АТФ. На «холостое» вращение «ротора» протоны не тратятся!

Многие детали работы этой молекулярной машины пока неизвестны, но в общих чертах это выглядит так. Протоны, проникая к

основанию комплекса F_1 через входной канал комплекса F_0 , контактирующий с «кислой» средой цитоплазмы, протонируют карбоксильные группы аминокислот белка субъединицы c (это аспарагин и аргинин). Взаимодействие и обмен протонами между соседними единицами c и a вызывает конформационную перестройку структуры белков, результатом которой является поворот подвижной части F_1 (предположительно совместно с субъединицей c) скачком на 120° на каждую пару вошедших протонов. Предполагается, что поступившие в ферментный комплекс протоны принимают участие в протонировании аминокислот β субъединиц, что вызывает в них конформационные переходы, сопровождающиеся изменением их сродства к участникам реакции фосфорилирования (АДФ, Ф, АТФ). В частности, установлено, что синхронно с вращением «роторной» части комплекса происходит протонирование субъединицы β и ассоциация её с АДФ и Ф, затем конденсация этих субстратов с образованием АТФ и H_2O , сильно связанных с субъединицей, и на следующем этапе – депротонирование субъединицы с высвобождением протонов в щелочную среду матрикса. Последний этап конформационного перехода сопровождается резким уменьшением сродства β субъединицы к АТФ (примерно на 6 порядков!) и отщеплением продуктов фосфорилирования. Стехиометрия процесса такова, что на каждый скачок в повороте ротора синтезируется 1 молекула АТФ, а на один полный оборот соответственно - 3 молекулы. В нормальных физиологических условиях ротор может совершать до 17 оборотов в секунду, обеспечивая скорость синтеза около 50 молекул АТФ в одном комплексе в секунду.

Разумеется, синтез АТФ идёт за счёт высокого сродства сопрягающей реакции трансмембранного переноса протона, но *как* организован процесс сопряжения? Как показали измерения, в активном центре ферментного комплекса реакция синтеза АТФ



находится в термодинамическом равновесии. Это невозможно в водном растворе. Но в активном центре комплекса F_0F_1 , конформационные изменения, вызванные протонированием, приводят к двоякому преобразованию сродства: дегидратация отрицательно заряженных реагентов АДФ и Ф, которая в водной среде понижала их свободную энергию и, возможно, их принудительное сближение против сил их электростатического отталкивания (величина этой «энтальпийной» части сопряжения пока неизвестна) и главное уменьшению активности продуктов реакции. Сильное связывание АТФ и, возможно, связывание или выброс воды из реакционного центра резко уменьшают вероятность обратной реакции. Это типичный пример «энтропийно-

20» механизма сопряжения. При этом основная часть электрохимического потенциала протонов затрачивается на дегидратацию АДФ и Ф и на выведение АТФ из активного центра в водную фазу. В ней АТФ становится макроэргом, но самопроизвольно гидролизироваться до АДФ и Ф не может в отсутствие необходимого фермента. Иначе говоря, участники сопрягаемой реакции, невыгодной в водной среде, переносятся в специально организованную полость активного центра фермента, где она становится энергетически возможной, а свободная энергия сопрягающего процесса передаётся на конформационные степени свободы фермента и тратится на совершение работы по захвату и высвобождению участников реакции.

Успехи в изучении устройства мембранной АТФ-синтазы и общей схемы её работы были также увенчаны Нобелевской премией (П. Бойер и Д. Уолкер 1997 г.). Таким образом, конформационная гипотеза, хотя и в сильно изменённом виде, также нашла своё место в теории окислительного фосфорилирования. Если хемиосмотическая гипотеза объяснила *термодинамику* сопряжения окисления и фосфорилирования, то конформационная гипотеза объяснила молекулярный *механизм* реализации протонного потенциала в химической реакции синтеза АТФ.

Важно отметить, что эта молекулярная машина способна работать обратимо: если электрохимический протонный потенциал превышает необходимый для синтеза АТФ при текущих значениях активностей АДФ, Ф и АТФ, идёт синтез АТФ, если нет, то, наоборот, за счёт гидролиза АТФ ротор ($\gamma + \epsilon$) начинает вращаться в другую сторону и возникает обратный поток протонов через АТФ-ситназный комплекс, а протонный потенциал на мембране нарастает до равновесного значения:

$$\Psi \cdot e = (\varphi - 0,06 \cdot \Delta pH) \cdot e = (30.4 + RT \cdot \ln\{[АТФ]/[АДФ] \cdot [Ф]\}) \text{ кДж.} \quad (3.26)$$

Следует отметить ещё одно важное физическое свойство мембранного потенциала. В состоянии термодинамического равновесия потенциал должен быть одинаков по всей поверхности мембраны. Характерное время выравнивания электрического потенциала определяется максвелловским временем, зависящим от электрофизических свойств среды и геометрии системы. Оценкой его является отношение диэлектрической постоянной к удельной электропроводности: ϵ/σ . В водной фазе ϵ не превышает $80\epsilon_0 = 8 \cdot 10^{-11}$ Ф/м, а в примембранном слое, где вода сильно структурирована, ещё меньше. Удельная проводимость цитоплазмы приблизительно $\sigma = 0,1 \text{ Ом}^{-1}\text{м}^{-1}$.

Это даёт для характерного времени величину, не превышающую по порядку наносекунды. Учёт реальной геометрии несколько увеличит её, но она остаётся достаточно малой величиной. Характерное время латерального выравнивания диффузионного потенциала определяется временем диффузии ионов водорода вдоль поверхности мембраны, которое можно оценить как x^2/D . Величина смещения x не превышает размера митохондрии, 10^{-6} м, коэффициент диффузии D протонов в структурированной воде порядка 10^{-4} м²/с, поэтому характерное время латерального диффузионного выравнивания активности ионов водорода < 30 нс. Следовательно, за это время электрохимический потенциал равномерно «размажется» по всей мембране, независимо от того, в каком месте он возник. Это создаёт благоприятную возможность быстрого обеспечения энергией тех участков клетки, которые удалены от места генерации потенциала. Такая передача энергии занимает значительно меньше времени, чем диффузия АТФ от места синтеза к месту его потребления, если они почему-либо разделены. Действительно, было обнаружено, что в мышечных волокнах митохондрии имеют форму не изолированных эллипсоидов, как это обычно представляли, а сильно вытянутых структур, соединённых между собой своими торцами и образующих целую систему трубок (электрических «кабелей»), охватывающую весь объём мышечного волокна (рис. 3.11).

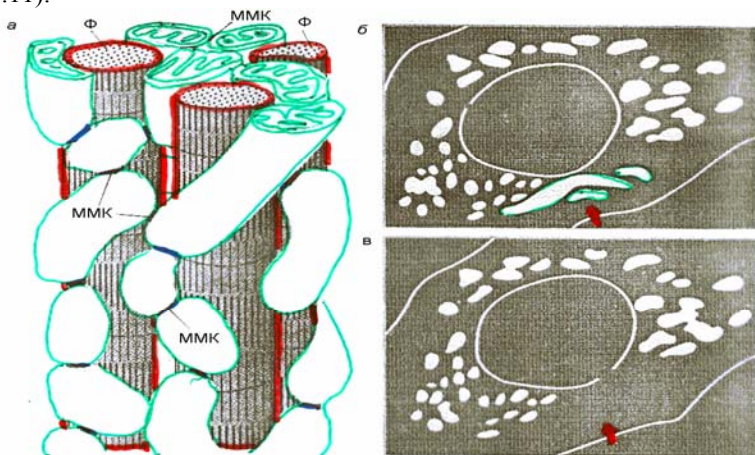


Рис. 3.11. Энергосистема в мышце. а – схема расположения митохондрий и миофибрилл (Ф); ММК – межмитохондриальные контакты; б – флуоресцирующие митохондрии в изолированной клетке, стрелка

кой указана одна из митохондрий перед облучением, в – та же клетка после облучения (исчез потенциал и погасла флуоресценции целой группы митохондрий, связанных друг с другом с помощью ММК)

Электродиффузионный механизм передачи энергетического потенциала в такой геометрии системы очень уместен. Похожий процесс передачи потенциала по сопрягающей мембране на значительные расстояния (вплоть до миллиметра!) был обнаружен и у многоклеточных фотосинтезирующих цианобактерий – трихом. Клетки этой бактерии соединены последовательно в длинную цепь и способны передвигаться по твердой поверхности вдоль своей оси, подобно дождевому червю. Источником энергии при этом служит свет, создающий электрохимический потенциал протонов на мембране, прилегающей изнутри к внешней оболочке клетки. Оказалось, что в торцах клеток, которыми они скрепляются друг с другом, имеются маленькие сквозные отверстия, через которые потенциал мембраны выравнивается по всей цепочке клеток. При этом потенциал, возникающий в отдельных клетках при освещении их светом, моментально размазывается по всей бактерии, обеспечивая энергией каждую клетку. В опытах с цианобактериями был обнаружен также неожиданный эффект: оказалось, что движение бактерий происходит без участия АТФ, а непосредственно за счёт энергии протонного потенциала на мембране! Этот чрезвычайно важный результат лишает АТФ права на монополию в биоэнергетике клетки и даёт повод задуматься о более общем значении протонного потенциала, чем то, которое ему отводилось в гипотезе Митчела изначально. Но прежде чем перейти к такому обобщению, вернёмся к процессам в митохондриальной мембране и уточним некоторые детали.

Схема работы сопрягающей мембраны, показанная на рис. 3.9а, конечно, сильно упрощена. Этот рисунок преследует цель показать аналогию сопрягающей мембраны с топливным элементом, известным физикам, который способен окислять топливо (например, водород), подводимое к одному электроду, окислителем (например, кислородом), подводимым к другому электроду. Разность окислительно-восстановительных потенциалов этой редокс пары реализуется в виде электродвижущей силы для внешней электрической цепи. Эта аналогия вполне правомерна. Однако на самом деле путь электрона через мембрану более сложен. Он пересекает мембрану трижды, пока доберётся до кислорода. В свою очередь протоны тоже переносятся через мембрану в нескольких местах в составе нейтральных соединений на обратных участках перемещения электронов. Поэтому реаль-

ная сопрягающая мембрана составлена из параллельно соединённых участков, каждый из которых вносит свой вклад в суммарный ток через мембрану при электродвижущей силе, составляющей примерно одну треть от полной разности окислительно-восстановительных потенциалов между донором (НАДН₂, $-0,3$ В) и акцептором (О₂, $+0,8$ В.). Реально наблюдаемая величина мембранного потенциала близка к этому ожидаемому значению $\sim 0,35$ В. Более полная схема движения электронов и протонов представлена на рис. 3.12.

Справедливости ради нужно отметить существование другой версии хемиосмотической гипотезы, впервые выдвинутой Р. Вильямсом и долго развивавшейся Л.А. Блюменфельдом. По этой версии трансмембранное разделение протонов при окислении восстановленных переносчиков не сопровождается их накоплением в водном объёме, а ограничивается приповерхностной областью мембраны. При этом возникают лишь локальные перепады рН и электрического потенциала, которые непосредственно влияют на конформацию прилегающих белковых комплексов и в принципе способны обеспечить энергетические потребности АТФ-синтазы. Существует ряд экспериментов, которые можно толковать в пользу этого варианта. Но вся огромная совокупность экспериментального материала, относящегося к окислительному фосфорилированию на сопрягающих мембранах, уже вряд ли может быть совместима с этой гипотезой. Да и приведенные выше оценки скорости латерального выравнивания мембранного потенциала говорят против неё.

Соотношения вклада электрической и диффузионной доли в общую величину электрохимического потенциала различаются у разных клеток и организмов. Но для энергетики синтеза АТФ с позиций гипотезы Митчелла важна лишь их сумма. Поскольку химическое сродство реакции синтеза АТФ в физиологических условиях составляет (см. формулу 3.14) – $11,4$ ккал/М или – $47,5$ кДж/М, а это соответствует около $0,5$ эВ на одну молекулу, то, зная величину мембранного потенциала, легко сделать вывод, что для синтеза одной молекулы АТФ через грибок АТФ-синтазы должно пройти как минимум 2 протона. Действительно, различные АТФ-синтазы используют 2-3 протона при синтезе одной молекулы АТФ. Такой высокий коэффициент полезного действия АТФ-азной машины впечатляет, но не удивляет. Ведь ограничения на коэффициент преобразования энергии, которое накладывает теорема Карно, распространяется только на *тепловые* циклы.

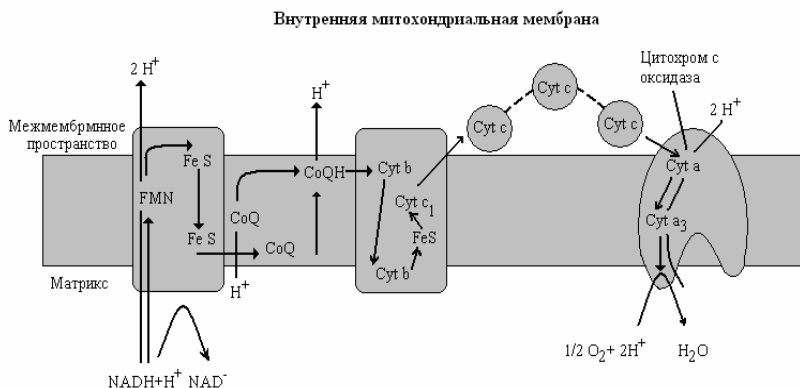


Рис. 3.12. Переносчики электронов и протонов в митохондриальной мембране. Здесь FeS – железосерные белки, CoQ – убихиноны (хиноны с углеводородным хвостом, позволяющим хинону растворяться и свободно диффундировать в мембране), CoQH₂ и CoQH – полу- и полностью восстановленные его формы, цитохромы Cyt b, c₁, c_a, c_{a3} – белки, содержащие гемовое железо, локализованные в мембране, Cyt c – водорастворимый цитохром c

Полезно оценить также суммарный трансмембранный электронный (и равный ему протонный) ток, который протекает через мембраны всех митохондрий человека. Если вспомнить, что мощность основного метаболизма человека средней упитанности примерно 70 Вт, а более 90% энергетики организма обеспечивается за счёт митохондриального окисления, то, приняв за ЭДС цепи переноса величину 1,1 В, легко получить для тока значение 65 Ампер. При совершении человеком какой-либо простой работы этот ток уже превышает 100 А.

3.6. Энергетическая система живой клетки

Эксперименты, подобные приведенным выше, навели на мысль, что роль электрохимического потенциала вероятно шире, чем просто как временное хранилище свободной энергии для синтеза АТФ. Это предположение получило обширное подтверждение. Оказалось, что энергия протонного потенциала непосредственно обеспечивает *без посредничества АТФ* большой класс биофизических процессов. Некоторые из них перечислены на рис. 3.13.

В качестве интересного примера можно привести молекулярный мотор, приводящий в движение жгутик бактерии. В основании жгутика в мембране находится «ротор», который приводится во вращение потоком протонов из наружной среды в цитоплазму бактерии. На перенос по электрохимическому потенциалу нескольких сотен протонов ротор совершает один оборот, а частота вращения может достигать нескольких сотен герц. Коэффициент полезного действия такого мотора близок к единице. Оказалось, что во многих случаях клетка в качестве аккумуляторов и преобразователей энергии использует не ионы водорода, а ионы натрия. Их во внеклеточной среде гораздо больше, чем ионов водорода, поэтому энергетическая ёмкость таких устройств может быть выше, чем протонных. Разнообразие фундаментальных носителей энергии и множество биофизических способов их использования позволяет представить новую структуру энергетической системы клетки (рис. 3.13.), в которой АТФ уже лишена своей прежней монополии.

1. Светочувствительные мембраны фотосинтетического аппарата.
2. Окисление на мембранах митохондрий.
3. Фосфорилирование на мембранах митохондрий.
4. Вращение бактериальных жгутиков.
5. Вторичный активный транспорт.
6. Химический синтез (например, АТФ).
7. Термогенез в митохондриях бурого жира.
8. Трансмембранный ионный обмен в бактериях и растениях.
9. Мембранное окисление в морских аэробах.
10. Фосфорилирование в бактериях.
11. Вращение бактериальных жгутиков.
12. Вторичный активный транспорт.
13. Химический синтез (например, АТФ).
14. Термогенез в митохондриях бурого жира.
15. Механические движения в актомиозиновых комплексах.
16. «Мышечная дрожь».
17. Клеточный биосинтез.
18. Активный транспорт.
19. Субстратное фосфорилирование при гликолизе.

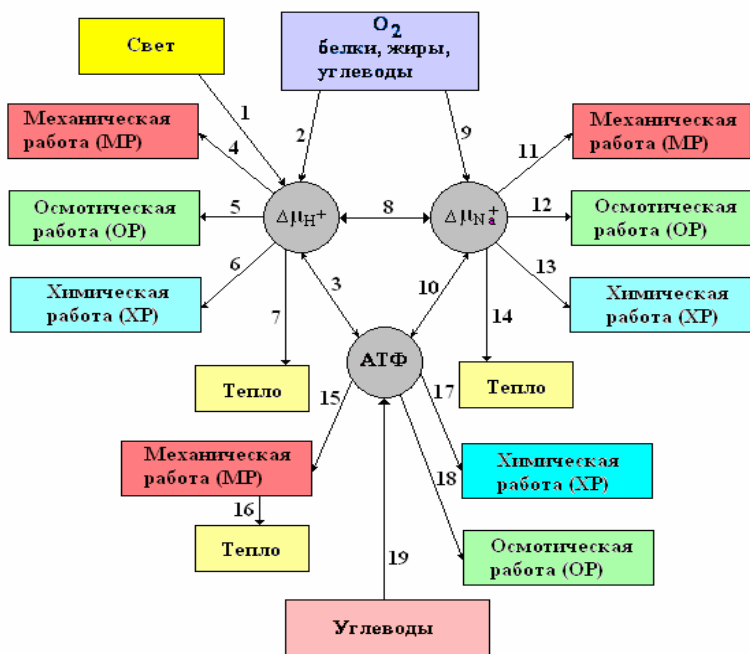


Рис. 3.13. Взаимосвязь источников, носителей и потребителей свободной энергии в клетке

Часть из этих процессов уже встречалась нам, с некоторыми из остальных мы познакомимся позже.

Подводя итоги данного раздела, можно, следуя В.П. Скулачёву, сформулировать *законы биоэнергетики*:

- Живая клетка избегает прямого использования энергии внешних ресурсов для своих внутренних нужд. Она сначала конвертирует её в одну из трёх форм: макроэрг АТФ, электрохимический потенциал протонов или электрохимический потенциал ионов натрия, которые затем использует для осуществления различных энергопотребляющих процессов.
- Любая живая клетка всегда располагает как минимум двумя формами «энергетической валюты»: водорастворимой (АТФ) и связанной с мембраной.

- Энергетические валюты могут превращаться друг в друга. Поэтому получения хотя бы одной из них за счёт внешнего ресурса достаточно для поддержания жизнедеятельности клетки.

На рисунках 3.14- 3.17 приведены схемы взаимосвязи разных видов свободной энергии в клетках различных организмов, которые иллюстрируют эти законы.

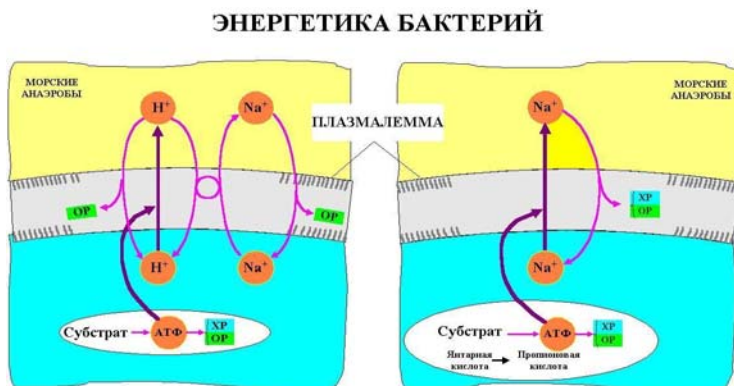


Рис. 3.14. Морские анаэробные бактерии.

Основной источник энергии – субстратное фосфорилирование при расщеплении углеводов. Часть АТФ при этом расходуется на создание $\Delta\mu_{H^+}$, на внешней мембране, которое в свою очередь может обмениваться на $\Delta\mu_{Na^+}$. У пресноводных анаэробов, живущих в среде с дефицитом Na^+ , последний процесс отсутствует. У некоторых морских анаэробов μ_{H^+} совсем не используется и АТФ сразу расходуется на создание $\Delta\mu_{Na^+}$.

ЭНЕРГЕТИКА БАКТЕРИЙ

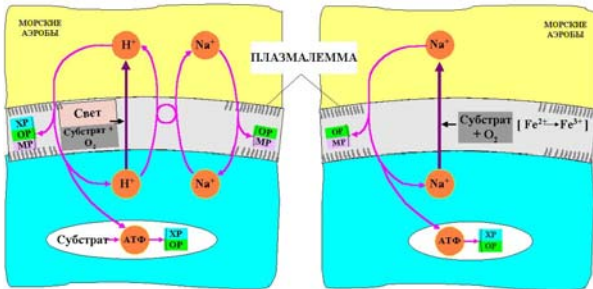


Рис. 3.15. Морские аэробные бактерии.

Основной источник энергии - протонная помпа во внешней мембране, создающая $\Delta\mu_{H^+}$ на ней за счёт энергии света или окисления субстратов дыхания (углеводов, жиров или белков) кислородом, как в митохондриях. АТФ также синтезируется и через мембранную АТФ-синтазу, и посредством субстратного фосфорилирования в объёме клетки. $\Delta\mu_{H^+}$ так же может с помощью ионообменника конвертироваться в $\Delta\mu_{Na^+}$. В пресноводных бактериях последний путь отсутствует. У бактерий, не имеющих протонной фотопомпы, основным источником энергии является $\Delta\mu_{Na^+}$, на внешней мембране, возникающий при дыхательном окислении неорганических субстратов.

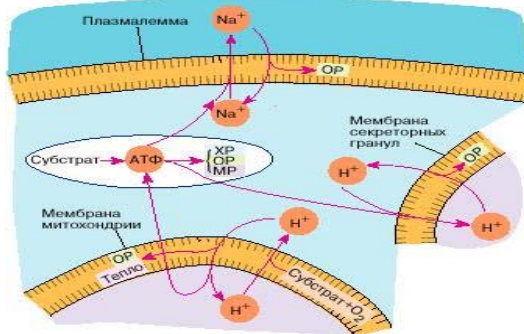


Рис. 3.16. Энергетика животной клетки отличается большим разнообразием энергоносителей.

Основным носителем служит $\Delta\mu_{H^+}$, возникающий на митохондриальной мембране дыхательном окислении. Он легко превращается в АТФ с помощью мембранной АТФ-синтазы. Другим источни-

ком АТФ служит субстратное фосфорилирование в объёме. АТФ в свою очередь широко используется во внутриклеточных процессах и может конвертироваться в протонный потенциал на мембранах секреторных гранул или в $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ на внешней клеточной мембране

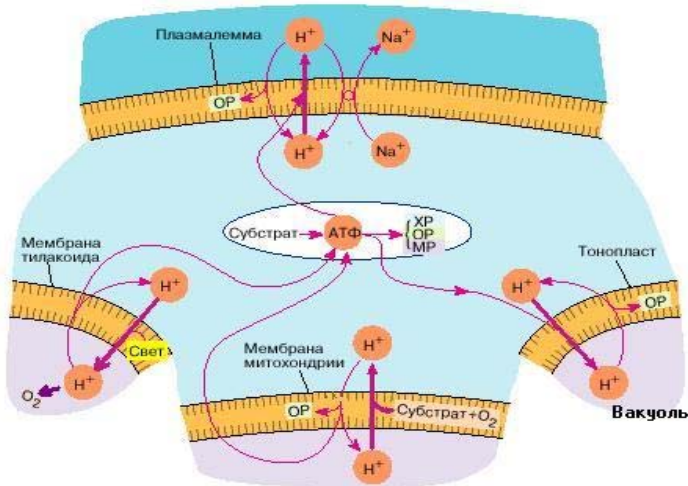


Рис.3.17. Энергетика растительной клетки.

Здесь первичным источником энергии служит свет, создающий $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ на мембране тилакоидов и синтезируемая за счёт него АТФ. Другим источником энергии являются углеводы, создаваемые посредством фотосинтеза и окисляемые в митохондриях с созданием протонного потенциала и синтезом АТФ. АТФ используется для создания $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ на мембранах вакуолей.

В дальнейшем, рассматривая вопросы переноса и преобразования вещества и информации в живой системе, мы неизбежно столкнёмся с конкретными источниками и механизмами преобразования свободной энергии в этих диссипативных процессах.

Выше неоднократно упоминалась важная роль световой энергии, которую может использовать живая система. Действительно, оптическое возбуждение электронной системы биомакромолекул и последующие электрохимические и конформационные процессы являются эффективным инструментом использования фотонов живым организмом. Оставляя информационный (сигнальный) аспект этого явления для жизнеобеспечения организма до изложения вопросов

биорецепции, остановимся здесь лишь на *биоэнергетической* стороне проблемы. Учитывая исключительное значение световой энергии для биоэнергетики в целом, мы вынесем рассмотрение этого вопроса в отдельный раздел.

4. Биофизика фотосинтеза.

Фотосинтез в прямом смысле это – синтез углеводов под действием видимого света. В более широком и ставшем популярным смысле – это весь комплекс процессов ассимиляции фотонов и химических субстратов в растительном организме, которые приводят к его росту и развитию. Сюда, разумеется, входят и процессы синтеза пигментов, обеспечивающих поглощение фотонов и первичные фотохимические реакции, и других соединений, отвечающих за формирование органов растительного организма и его приспособление к условиям окружающей среды. Наблюдения за загадочным процессом фотосинтеза продолжаются уже несколько веков. Однако лишь период конца XVIII века, когда на смену ошибочным гипотезам об определяющей роли почвенных минеральных элементов, а позже – почвенной воды, как пластических материалах для образования биомассы растений, пришло представление об атмосферных газах как о главных участниках процесса фотосинтеза (Д. Пристли, К. Шееле и Я. Ингенхауз), можно считать началом познания *научной* сущности фотосинтеза. За последние 200 с лишним лет фотосинтез из биологической, а затем и физиологической науки превратился в науку биофизическую, составившую значительную часть всей современной биофизики. Участниками создания современных представлений о природе фотосинтеза стал целый ряд выдающихся учёных, достижения которых были отмечены многими Нобелевскими премиями. Изложить скольконибудь полно состояние этого раздела биофизики в данном кратком пособии не представляется возможным. Поэтому мы опустим описание удивительно интересной и поучительной истории изучения фотосинтеза и ограничимся кратким очерком современных представлений о биофизической сущности процессов фотосинтеза, которые обеспечивают его высокую энергетическую эффективность.

4.1. Элементы физиологии фотосинтеза

Многие живые организмы способны к фотосинтезу. Даже в каждом слое млекопитающих идёт под действием света синтез химических соединений (вспомним синтез витамина D у детей и меланина,

отвечающего за загар). Но основными объектами исследований фотосинтеза и практического использования его продуктов являются растения и водоросли, в том числе микроорганизмы. У высших растений основная масса синтезируемых соединений производится в листьях. Но и в других частях растений идут фотосинтетические процессы, управляющие развитием цветков, семян, изменением формы растений и их пространственной ориентацией. Участники и механизмы этих процессов изучены пока недостаточно, хотя подобное *сигнальное* действие света представляет большой научный и практический интерес.

Фотосинтетические процессы в листьях растений локализованы в специальных органеллах, называемых хлоропластами (*зелёными тельцами*). Внутреннее пространство хлоропласта, показанное на рис. 4.1., заполнено пластинчатыми гранулами зелёного цвета (*граны*). Граны представляют собой стопки сильно сплюснутых мешочков – *тилакоидов*. Стенки тилакоидов (*ламеллы*) представляют собой тонкие (около 5 нм толщиной) фосфолипидные мембраны, внутри которых находятся липотропные участники первичных процессов фотосинтеза (пигменты, белки, переносчики электронов и протонов). Внутреннее межмембранное пространство *тилакоидов* (толщиной 3-5 нм) является водной средой, содержащей водорастворимые участники процесса. В межгранальном (*стромальном*) пространстве, представляющем собой водную среду, находятся менее упакованные отдельные тилакоиды и ламеллы.

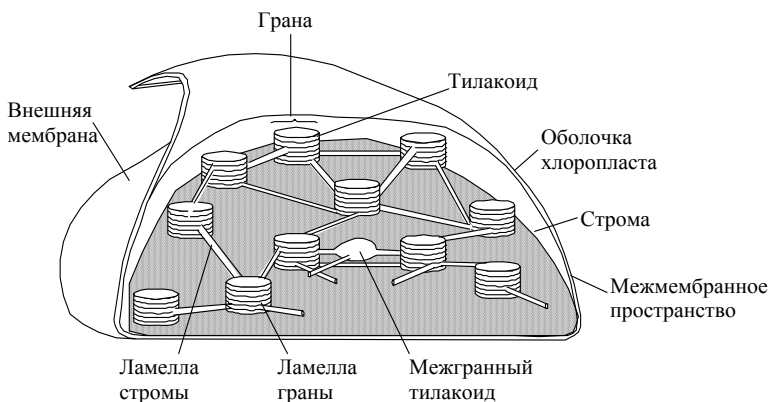


Рис. 4.1. Внутреннее устройство хлоропласта

У фотосинтезирующих бактерий нет хлоропластов, а участники процесса фотосинтеза расположены в мембранах, подобных ламеллам высших растений, но расположенных под внешней оболочкой микроорганизма и образующих замкнутое пространство. Замкнутая топология мембранных образований и в хлоропластах, и в бактериях – важное условие, поскольку при функционировании фотосинтетического аппарата на этих мембранах, как и в митохондриях, возникает электрохимический потенциал для протонов.

4.2. Квантовая биофизика фотосинтеза

Основная продукция фотосинтеза, это – соединения с высоким восстановительным потенциалом – углеводы, в первую очередь глюкоза и её высокомолекулярные производные (типа крахмала). Рабочим телом фотосинтетической машины в высших растениях и некоторых водорослях является вода. Физическая сущность первичного процесса фотосинтеза – это разложение воды с помощью квантов света на кислород и водород. Однако прямое одноквантовое разложение молекулы воды возможно лишь с помощью ультрафиолетовых квантов (энергия связи О–Н составляет около 4,4 эВ, что соответствует кванту с длиной волны около 280 нм), которых практически нет в спектре солнечного излучения у поверхности Земли. Вспомним, что молекула воды (рис. 4.2.) – электронейтральное, но сильно поляризованное соединение. В силу высокого сродства атомов кислорода к электронам водородные электроны в молекуле воды сильно смещены к атому кислорода. Разложение изолированной молекулы воды на компоненты требует их возврата к водороду, а это возможно лишь при участии высоковозбужденных состояний электронов. Промежуточные продукты этого процесса (свободные радикалы) химически агрессивны и способны быстро разрушить химический комплекс, который рискнул бы обеспечить подобный процесс прямого фотолиза воды.

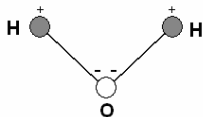


Рис. 4.2. Схема молекулы воды

В то же время разность окислительно-восстановительных потенциалов водорода и кислорода (таблица 2) равна 1,23 В. Это означает, что

в стабильных продуктах разложения воды запасается в расчёте на перенос одного электрона всего 1,23 эВ свободной энергии, т. е. значительно меньше, чем затрачивается на активацию переноса квантом света. Значит, должен существовать более экономный способ разложения воды другим путём. И природа нашла этот путь. Это путь фототоллиза воды, сенсibilизированного к *видимой* области солнечного спектра с помощью *фотокатализатора*.

Сущность процесса фотосенсибилизации состоит в отделении процесса оптического возбуждения от самого процесса разложения воды и в использовании для этого более *мягких* квантов, удовлетворяющих термодинамической оценке, приведенной выше. Простейшая схема такого процесса изображена на рис. 4.3.

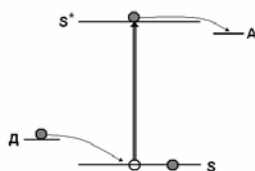


Рис. 4.3. Схема фотокатализа окислительно-восстановительного процесса

Здесь возбуждение сенсibilизатора сопровождается переносом электрона с верхнего возбуждённого энергетического уровня на акцептор А, а электронная вакансия на нижнем основном уровне заполняется от донора Д. После этих актов молекула сенсibilизатора возвращается в исходное состояние. Электрон от акцептора А[•] может использоваться в *темновых* реакциях восстановления последующих реагентов, а *дырка* на доноре Д⁺ может участвовать в *темновых* процессах окисления, например, воды, т. е. с помощью некоего дополнительного катализатора *вытаскивать* электроны из потенциальной ямы на кислороде воды без образования высоко возбуждённых промежуточных продуктов. Последнее, в принципе, возможно, если этот катализатор способен накапливать *дырки* до такого количества, которое достаточно для *аккордного* разложения воды с образованием сразу стабильного конечного продукта разложения, например, *молекулярного* кислорода O₂ из двух молекул воды.



Требования, предъявляемые к сенсibilизатору достаточно простые. Прежде всего это должна быть молекула, способная к возбуждению электронов квантами видимого света (их энергия лежит в диапазоне 1,75÷3 эВ > 1,23 эВ). Время жизни этого возбуждённого со-

стояния, определяемого скоростью излучательных и без излучательных переходов электрона в основное состояние, должно быть достаточно велико, чтобы перенос зарядов на А и Д, успевал произойти до его релаксации. Энергетическое положение основного и возбуждённого уровней сенсibilизатора должно термодинамически позволять электрону и дырке переходить на А и Д спонтанно. И, наконец, сенсibilизатор должен быть достаточно стабильным материалом по отношению к действию света и целевых и побочных продуктов фотореакций. Этим условиям удовлетворяет множество химических соединений. Природа выбрала одно из соединений ряда тетрапиролов, а именно *хлорофилл*. Формула хлорофилла *a* приведена на рис. 4. 4.

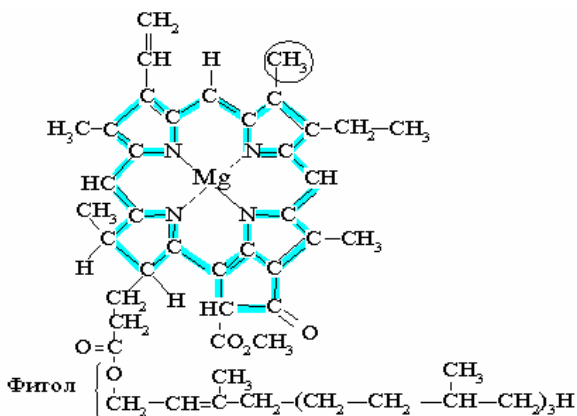


Рис. 4.4. Химическая формула хлорофилла *a*

Хлорофилл *b* отличается от хлорофилла *a* наличием группы $\text{—}\overset{\text{O}}{\text{C}}\text{—}\text{CH}_3$ вместо отмеченной кружочком группы CH_3 . Плоская гемомгруппа, отмеченная жирной линией, является высокосопреженной системой, в которой делокализованы электроны., обладает гидрофильными свойствами. Гидрофобный фитольный хвост, показанный на рисунке в сложенном состоянии, обеспечивает связывание хлорофилла с фосфолипидами мембраны и с гидрофобными областями хлорофилл-связывающих белков. Эти амфотерные свойства хлорофилла способствуют самосборке агрегатов хлорофилла на границе липид-вода и на поверхности белков, где чередуются гидрофильные и гидрофобные участки. Структура центральной части хлорофилла аналогична гемму железа в молекуле гемоглобина или цитохромах и обеспечивает поглощение света в видимом диапазоне. Спектры поглощения хлоро-

филлов *a*, *b* и *c* качественно похожи. Их типовой вид изображён на рис. 4.5. Явно выражены две полосы поглощения: в красной области (в районе 660–680 нм) и в синей области (в районе длин волн 450 нм). Они обусловлены соответственно возбуждением в

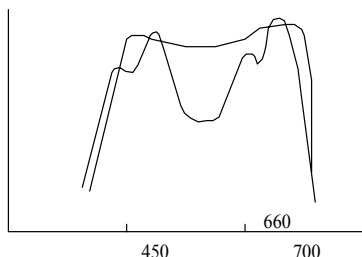


Рис. 4.5. Типичный вид спектров поглощения хлорофиллов – сплошная кривая, спектр поглощения хлоропластов – пунктирная кривая.

первое и второе синглетные состояния. Энергетические уровни, участвующие в возбуждении, показаны на рис. 4.6.

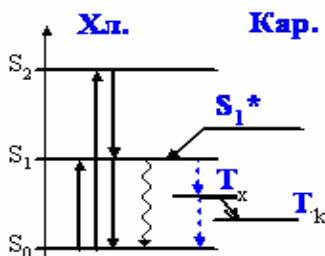
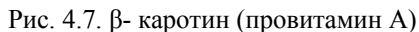


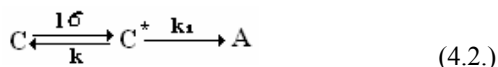
Рис. 4.6. Уровни энергии хлорофилла и β -каротина. S_0, S_1, S_2 , – основное и возбуждённые синглетные состояния хлорофилла, S^* – синглетно-возбуждённое состояние каротина, T_x и T_k – триплетно возбуждённые состояния пигментов. Сплошные восходящие стрелки – оптические переходы, сплошные нисходящие стрелки – без излучательные переходы в молекуле хлорофилла, волнистая стрелка – флуоресценция хлорофилла, пунктирные стрелки – оптически запрещённые переходы, наклонные стрелки – межмолекулярные переносы энергии



Способность молекул хлорофилла к фотоокислению и фотовосстановлению по схеме, приведенной на рис. 4.3, показана экспериментально в опытах *in vitro* с искусственными донорами и акцепторами (реакции Красновского). В природном фотосинтетическом аппарате скорость фотоокисления хлорофилла значительно превосходит скорость его фотовосстановления. Таким образом, молекула хлорофилла удовлетворяет всем требованиям, необходимым для выполнения функции сенсibilизатора. В природном фотосинтетическом аппарате функции поглощения света и разделения зарядов разделены и выполняются разными молекулами хлорофилла. Это обусловлено

следующими обстоятельствами. Комплекс хлорофилла с донорами, акцепторами и белками, осуществляющими первичный захват и преобразование энергии, представляет собой сложное и громоздкое образование. Плотность же потока фотонов в реальных условиях относительно низка: в прямом солнечном свете в полдень порядка 10^{17} фотонов на кв. см за с, а в рассеянном дневном свете в среднем на 2–3 порядка меньше. Молекулярная экстинкция хлорофилла в максимуме поглощения характеризуется эффективным сечением поглощения около 4 кв. ангстрем, т. е. $4 \cdot 10^{-16} \text{ см}^2$ (что в 50 раз меньше геометрической площади сечения молекулы). Значит, частота оптического возбуждения каждой молекулы составляет 0,04–0,4 в с, и средний период возбуждения молекулы (2,5–25 с) в десятки-сотни раз больше характерного времени разделения и стабилизации зарядов (составляющего величину порядка десятых и сотых долей секунды), и такой сложный и *дорогой* молекулярный агрегат будет в основном простаивать. Поэтому в реальной фотореакционной системе фотохимически активная молекула хлорофилла окружена десятками и сотнями инертных молекул хлорофилла, образующих светособирающую *антенну* и передающих энергию возбуждения фотореакционному центру, непрерывно загружая его работой. Сам же фотореакционный центр содержит не одну молекулу хлорофилла, а несколько определённым образом расположенных молекул, в том числе димер, а иногда и феофитин (безметалльный хлорофилл), что увеличивает эффективность захвата возбуждения из антенны и скорость первичного разделения зарядов.

Одно из главных качеств молекул хлорофилла, позволившее им занять ключевое место в фотосинтетическом аппарате, это весьма слабая связь первого возбуждённого состояния S_1 с колебательными степенями свободы молекул. Это проявляется в относительно продолжительной флуоресценции хлорофилла после выключения возбуждающего света. В разбавленных растворах хлорофилла флуоресцентное время жизни состояния S_1 составляет 5 нсек, а квантовый выход флуоресценции достигает 0,3. В хлоропластах же квантовый выход падает до 0,02, а время жизни сокращается до 0,3 нс. Это, скорее всего, обусловлено высокой скоростью захвата электрона акцептором. Из приведенных величин можно в рамках этого предположения оценить скорость этого захвата. Схема процесса выглядит следующим образом:



Здесь C – невозбуждённые молекулы хлорофилла, C^* – возбуждённые, A – восстановленный акцептор, I – интенсивность возбуждающе-

го света, σ – эффективное сечение поглощения, k – константа дезактивации, складывающаяся из константы тепловой дезактивации k_T и константы флуоресценции k_F . Переходом в триплетное состояние в данном случае можно пренебречь. Если общая концентрация пигмента $C_0 = C + C^*$, то кинетическое уравнение будет выглядеть так:

$$dC^*/dt = I\sigma (C_0 - C^*) - kC^* \quad (4.3)$$

Если $C^*(0) = 0$, то его решение:

$$C^*(t) = C^*_{CT} (1 - \exp(-t/\tau)), \quad (4.4.)$$

где $C^*_{CT} = C_0 k / (k + I\sigma)$, а $\tau = (k + I\sigma)^{-1}$. При реальной освещённости $I\sigma \ll k$, так что постоянная времени τ фактически совпадает с $k^{-1} = (k_T + k_F + k_A)^{-1}$.

После выключения света:

$$dC^*/dt = -k C^*, \quad (4.5)$$

откуда

$$C^* = C^*_{CT} \exp(-t/\tau) \quad (4.6)$$

Квантовый выход флуоресценции $\phi_F = k_F / k$. Для свободной молекулы хлорофилла, когда акцептора нет: $\phi_{F0} = k_F / (k_T + k_F) = k_F \tau_0$, в присутствии акцептора $\phi_F = k_F / (k_T + k_F + k_A) = k_F \tau$. Поэтому квантовый выход восстановления акцептора:

$$\phi_A = k_A / (k_T + k_F + k_A) = 1 - \phi_F / \phi_{F0} = 1 - \tau / \tau_0. \quad (4.7)$$

Используя экспериментальные значения: $\tau_0 = 5$ нс, $\tau = 0,3$ нс, $\phi_{F0} = 0,3$, $\phi_F \leq 0,02$, из (4.7) получим $\phi_A \geq 0,94$. Из вышеприведенных формул легко также получить, что $k_F = 0,6 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$, $k_T = 1,35 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$, $k_A = 3,1 \cdot 10^9 \text{ сек}^{-1}$. Отсюда видно, что в реакционном центре из всех альтернативных процессов релаксации возбуждённого состояния молекулы хлорофилла самым эффективным является захват электрона акцептором. Столь большая константа скорости захвата не может определяться диффузией реагентов. Значит, тесный контакт хлорофилла с акцептором существует заранее. Действительно, все непосредственные участники процесса и их ближайшие партнёры в дальнейших стадиях переноса зарядов образуют комплекс с фиксированным расположением элементов. Поэтому и при понижении температуры скорости возбуждения и разделения зарядов существенно не изменяются.

Как уже отмечалось выше, энергии одного кванта, поглощённого сенсibilизатором в схеме, приведенной на рис. 4.3, термодинамически достаточно для окислительно-восстановительного разложения воды, однако реально сложившиеся природные механизмы в различных фотосинтезирующих организмах несут следы длительной эволюции и не всегда реализуются по кратчайшему варианту. Так, в

первых фотопреобразователях этого типа, найденных природой на ранних этапах формирования живых систем, фотокатализаторы не могли создавать высокого окислительного потенциала. Эти преобразователи, получившие название фотосистемы 1 (ФС 1), стали источниками энергии для примитивных бактерий, которые были вынуждены ограничиваться использованием легко окисляемых доноров (как серные бактерии, использующие в качестве донора H_2S с редокс-потенциалом $+0,17\text{ В}$.) или обходиться вообще без внешних доноров и работать в циклически замкнутом режиме (как пурпурные бактерии). В этот период атмосфера не имела кислорода, и поверхность Земли подвергалась интенсивному воздействию ультрафиолета. Вероятно, среди многочисленных мутаций, характерных для этого периода, возникли такие, которые изменили состав белков в пигмент-белковом комплексе фотокатализатора и привели к сдвигу его редокс потенциалов в положительную сторону. В результате окислительный потенциал снизился до уровня около $+1,2\text{ В}$, что достаточно для окисления воды, но восстановительный потенциал также опустился и оказался недостаточным для восстановления воды. Такой преобразователь, получивший название фотосистемы 2 (ФС 2), мог работать без внешнего акцептора, но только в циклическом режиме движения электрона. Однако, когда обе фотосистемы встретились в одной клетке, они образовали замечательную дополняющую друг друга пару, способную забирать электроны из воды с выделением O_2 и переносить их на акцептор с потенциалом, достаточным для восстановления воды до H_2 в свободном виде или в связанном в составе углевода. Акцептором, подходящим для последней реакции, оказался пиридиннуклеотид НАДФ – близкий аналог НАД, знакомого нам по процессу окислительного фосфорилирования в митохондриях. Так как вода, наиболее доступный субстрат, то организмы, завладевшие таким эффективным и универсальным фотопреобразователем, получили очевидные эволюционные преимущества и быстро заняли обширную нишу в биосфере Земли. Энергетическая схема функционирования этого преобразователя в высших растениях и зелёных водорослях изображена на рис. 4. 8. Перемещение электрона по шкале окислительно-восстановительных потенциалов с участием двух квантов света для переноса каждого электрона получило название Z-схемы.

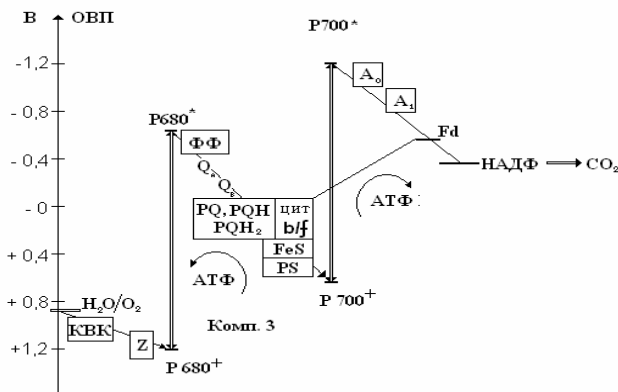
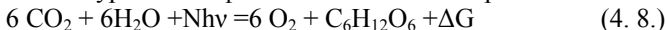


Рис. 4. 8. Z – схема фотосинтеза. По вертикальной шкале указаны окислительно-восстановительные потенциалы в вольтах. Использованы следующие обозначения: КВК – кислород-выделяющий комплекс, содержащий четырех ядерный кластер ионов Mn, Z – аминокислота тирозин, входящая в состав полипептидной цепи белка реакционного центра P680, $P680^+$ и $P680^*$ – ионизованное и возбужденное состояние фотоактивного центра ФС-2 соответственно, $P700^+$ и $P700^*$ – ионизованное и возбужденное состояние фотоактивного центра ФС-1, ФФ – феофитин, Q_A – сильно связанный хинон, Q_B – слабо связанный хинон, PQ – пластохинон, PQH – пластосемихинон, PQH_2 – пластогидрохинон, цит. b/f – комплекс цитохромов b и f, FeS – железосерный белок, PS – пластоцианин – медьсодержащий растворимый белок, A_0 – первичный акцептор (специальная молекула хлорофилла a), A_1 – акцептор филлохинольной природы (витамин K_1), Fd – ферредоксин – растворимый белок с активным центром в виде кластера $2Fe-2S$ кластером. Композицию переносчиков между ФС-2 и ФС-1 называют комплексом 3

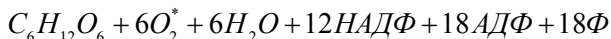
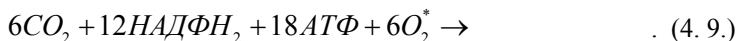
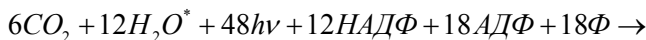
Фотореакционные центры фотосистем несколько отличаются друг от друга набором пигментов и их окружением и поэтому имеют отличия в положении максимумов в спектрах чувствительности. Фотоцентр фотосистемы 1 имеет максимум в дифференциальном спектре *фото-выцветания* (т. е. изменения поглощения при потере возбужденного электрона) на длине волны 700 нм и потому называется P700. Фотоцентр ФС-2 по такому же принципу обозначается как P680. Небольшое изменение длины волны падающего света в соответствии с раз-

ницей поглощения фотосистем позволяет, однако, чётко переключаться с возбуждения одной фотосистемы на возбуждение другой, что широко используется в экспериментальных исследованиях. Некоторые их результаты мы рассмотрим позже.

Основное уравнение фотосинтеза в высших растениях:



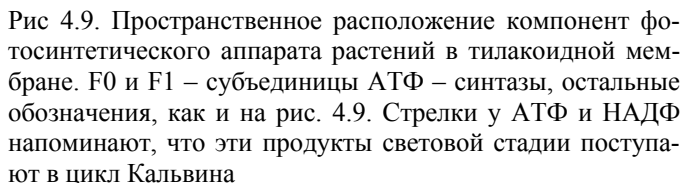
Эта реакция имеет положительное сродство только за счёт энергии света, и в итоге на один шаг реакции в её продуктах запасается $\Delta G = 686$ ккал свободной энергии. Однако это уравнение объединяет два этапа превращения субстратов, а именно световой и темновой, и не указывает важные промежуточные продукты. Запишем этапы раздельно:



Из этой записи видно, что продуктом световой стадии является восстановленные переносчики НАДФН₂ и АТФ, которые в темновой стадии восстановления углекислоты до глюкозы (*цикл Кальвина*) соответственно окисляются и гидролизуются. С помощью значка * здесь также подчеркнуто, что выделяемый кислород происходит из фоторазлагаемой воды, а вновь образуемая в темновой стадии вода содержит другой кислород. Квантовый расход, указанный здесь (48 квантов), является минимально необходимой величиной в рамках Z-схемы фотосинтеза. Он не учитывает вклада циклического потока электронов в синтез АТФ. Более реалистичная величина квантового расхода близка к 60.

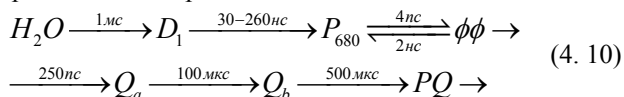
Восстановление НАДФ является результатом переноса электронов от воды до железосодержащего водорастворимого белка ферредоксина (Fd на рисунке) со стандартным редокс-потенциалом около 400 мВ. От восстановленного Fd электроны в основном идут на восстановление НАДФ, но частично могут возвращаться в пул пластохинонов, являющихся донором электронов для ФС-1, формируя циклическое движение. При этом энергия кванта, затраченная на возбуждение ФС-1, расходуется на создание электрохимического потенциала на мембране тилакоида. Этот потенциал, как и в митохондриях, создаётся не только за счёт электрического потенциала, связанного с трансмембранным переносом электронов (в данном случае на внешнюю сторону тилакоидной мембраны), но и за счёт трансмембранного диффузионного потенциала протонов. Дело в том, что при разложе-

Схема, изображённая на рис. 4.8., описывает события в энергетическом пространстве. Пространственное расположение участников световой стадии приведено на рис. 4.9.



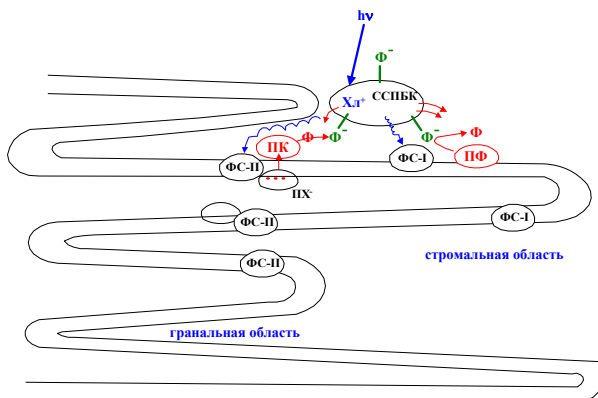
96

перёк мембраны от внутренней её поверхности к наружной и покрывает большую часть её полной толщины, составляющей 4 нм. Это обеспечивается как определённой ориентацией дипольного момента оптического перехода в хлорофилле, так и специальным расположением первичных акцепторов электронов по толщине мембраны. Это движение происходит против электрического потенциала, возникающего на мембране и достигающего величины около 100 мВ. Дополнительная затрата энергии, требуемая для его преодоления, составляет многие десятки мэВ. Спонтанность и необратимость такого движения электронов обеспечивается плавным увеличением окислительного потенциала переносчиков в ряду от возбуждённого хлорофилла до более долгоживущих восстановленных состояний переносчиков. Направленность перемещения электрона за пределами фотореакционных центров также обеспечивается взаимным расположением участников переноса в мембране и по шкале энергии. Это движение поддерживается за счёт свободной энергии электронов, полученной от квантов света. Диссипация этой энергии является платой за стабилизацию продуктов световой стадии. Зная разность редокс-потенциалов восстановления НАДФ и окисления воды ($\Delta E^0 = 0,81 + 0,32 = 1,13$ В) и энергию полутора молекул АТФ (это примерно 0,75 эВ), с одной стороны и минимально необходимую энергию двух квантов (в красной полосе поглощения хлорофиллов), а это примерно 3 эВ, с другой стороны, получим для коэффициента преобразования энергии $\eta = 1,88/3 = 0,63$. Весьма внушительная цифра! Столь значительная эффективность обеспечивается быстрым отводом электрона от возбуждённого состояния хлорофилла и сбросом части электронной энергии для затруднения обратного процесса рекомбинации. Это особенно актуально для ближайших к возбуждённому хлорофиллу акцепторов. Для более удалённых акцепторов скорость переноса уже не лимитирует вероятности рекомбинации. Эта стратегия организации процесса разделения в реальном фотосинтетическом аппарате хорошо видна из рис. 4.10, на котором для примера показаны характерные времена элементарных этапов переноса в ФС 2:



На выходе указанного участка электрон транспортной цепи в пуле пластохинонов (это 10÷20 одинаковых молекул) электроны (совместно с протонами) могут пребывать уже доли секунды, без угрозы возврата их в фотореакционный центр. С ближайших же к P680 акцепторов возврат электрона хоть и маловероятен, но возможен. Его регист-

рация в качестве задержанной флуоресценции даёт важную информацию о расположении переносчиков по шкале энергии. Вернёмся к роли антенного хлорофилла, о котором говорилось выше, но на приведенных рисунках эти образования не изображались. Существуют два типа антенных агрегатов. Один из пигмент-белковых комплексов (ПБК) тесно привязан к своему фотореакционному центру и поставляет энергию возбуждения только на P680 или P700 соответственно. Второй светособирающий пигмент-белковый комплекс (ССПБК) представляет собой агрегат, слабо связанный с мембраной и расположенный вне тилакоида. Он способен передавать энергию возбуждения в ПБК ФС-1 или ФС-2, в зависимости от своего расположения. Схема расположения фотосистем 1 и 2 на рис. 4.9, показывающая их тесный контакт, несколько упрощена. На самом деле форма гран в хлоропласте и расположение ФС 1 и ФС-2 в них зависит от многих физико-химических факторов (рН, температуры, ионной силы и т.п.). ФС-2 располагаются преимущественно в тилакоидных мембранах гранальной части, а ФС-1 преимущественно в мембранах стромальной области, и прямые контакты между ними не являются правилом (рис. 4.10). Обмен окислительно-восстановительными реагентами между ними осуществляется главным образом через подвижные переносчики: пластохиноны, пластоцианины и ферредоксины.



Регуляция потока возбуждения X_L^* от подвижного светособирающего пигмент-белкового комплекса (ССПБК) к ФС-2 и ФС-1 за счет фосфорилирования ССПБК протеинкиназой (ПК) и дефосфорилирования его протеинфосфатазой (ПФ). Избыток ПХ⁻ активирует ПК. Электростатические силы перемещают ССПБК от ФС-2 к ФС-1.

Рис 4.10. Схема расположения ФС-1, ФС-2 и ССПБК в мембранах тилакоидов и регуляции перемещения ССПБК

Между тем непременным условием эффективной работы фотосинтетического аппарата является сбалансированность уровней возбуждения фотореакционных центров ФС-1 и ФС-2. При большем возбуждении ФС-2 пул пластохинонов наполнится электронами из-за слабого изъятия их фотосистемой 1. При большем возбуждении ФС-1, наоборот, пул PQ обеднится электронами из-за слабого притока их от ФС-2. В обоих случаях сквозной поток электронов от воды на НАДФ будет лимитироваться слабо возбуждаемой фотосистемой. Поэтому выравнивание потоков квантов возбуждения на ФС-1 и ФС-2 является приоритетной задачей для системы регулирования. В основе её лежат два процесса.

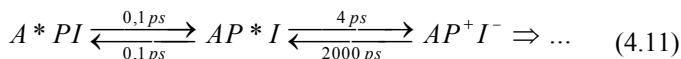
Один из них – прямое перетекание возбуждения (*спилlover*) от более возбуждённого ПБК к менее возбуждённому. Однако это возможно лишь при достаточном сближении фотосистем 1 и 2.

Второй процесс, более сложный. Он использует электростатические силы взаимодействия между фотосистемами и ССПБК. Дело в том, что ФС-1, ФС-2, ССПБК и сами мембраны имеют поверхностный заряд, как правило, отрицательный. Результирующее расположение всех участников взаимодействия является результатом баланса электростатических сил отталкивания и ван-дер-ваальсовых сил притяжения, которые при малых расстояниях, характерных для данного случая, весьма существенны. Полное решение этой сложной задачи пока невозможно. Но одно интересное явление, дающее значительный вклад в перемещение ССПБК, уже в некоторой степени изучено. Оно связано с активацией протеинкиназы избытком электронов в пуле PQ, который образуется, если интенсивность возбуждения ФС-2 выше, чем ФС-1. Протеинкиназа локализована около ФС-2 и при активации фосфорилирует белковую часть ССПБК. Фосфатные группы имеют отрицательный заряд, поэтому это увеличивает силы, выталкивающие ССПБК из межгранальной области в стромальную, где преимущественно располагаются агрегаты ФС-1. Однако вблизи ФС-1 находится протеинфосфатаза, которая отщепляет фосфатные группы от ССПБК и уменьшает их заряд. В отличие от протеинкиназы активность протеинфосфатазы постоянна. Поэтому баланс сил определяется в данном случае только активностью киназы, которая зависит от соотношения уровней возбуждения антенн ФС-1 и ФС-2. Такой чисто физический механизм управления потоками возбуждения не единственный. Избыток или дефицит электронов, возникающий в различных частях системы переноса электронов в зависимости от интенсивности возбуждения фотосистем 1 и 2, может непосредственно управлять и

другими физико-химическими процессами: скоростью фосфорилирования, синтеза сахаров, дыханием растений.

Эффективность работы фотосинтетического аппарата в немалой степени зависит от совершенства светосбора в антеннах ПБК и ССПБК. Природа довела это совершенство до высокой степени. Миграция захваченного антенной оптического возбуждения происходит при нормальных условиях с высокой скоростью и без потерь. В крупных антеннах десятки молекул хлорофиллов объединены в кластеры, в которых межмолекулярные расстояния не превышают 1,5 нм, а среднее время межмолекулярной передачи энергии составляет величину порядка 10^{-13} с. При таких тесных контактах кластер представляет собой квазикристаллическую систему, в которой, вероятно, реализуется экситонный механизм передачи энергии нейтрального возбуждения. Миграция энергии между кластерами, разделёнными более значительными расстояниями, происходит по индуктивно-резонансному механизму. Этот механизм остаётся эффективным при расстояниях между донорами и акцепторами энергии до нескольких нм, но требует перекрывания спектра флуоресценции донора и спектра поглощения акцептора. Поэтому он более эффективен в гетерогенной системе и формирует перенос, направленный от коротковолновых форм пигментов к длинноволновым. Это способствует направлению энергетического потока к самой длинноволновой форме пигмента, которым является фотореакционный центр фотосистемы. В результате общее время миграции энергии по антенне от попадания фотона до возбуждения реакционного центра не превышает 30–40 пс. Однако возбуждённый реакционный центр имеет большую вероятность вернуть возбуждение обратно в антенну, и только после нескольких попыток через несколько пс возбуждение фотореакционного пигмента заканчивается практически необратимым разделением зарядов. Здесь миграция *нейтрального* возбуждения сменяется переносом *заряда*, несущего энергию. Поэтому общее время жизни возбуждения в антенне, наблюдаемое по её флуоресценции, увеличено до нескольких сотен пс.

Схему этого процесса можно изобразить так:



Здесь А – пигменты антенны, Р – пигмент реакционного центра, I – первичный акцептор электрона. Характерные времена переноса выражены в пикосекундах.

После знакомства с механизмами процессов в фотосинтетическом аппарате растений нетрудно понять и его основные экспериментально наблюдаемые свойства. Перечислим наиболее известные из них.

1. Насыщение световой кривой фотосинтеза с ростом освещённости (рис. 4.11).

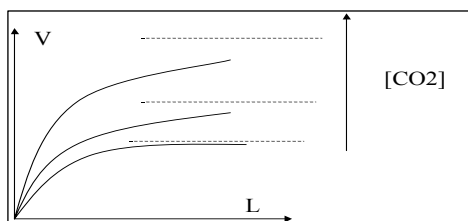


Рис. 4.11. По вертикальной оси – скорость ассимиляции углекислоты V , по горизонтальной оси – освещённость листа.

Кривые роста скорости фотосинтеза имеют явно выраженное насыщение, и предельное значение растёт с ростом концентрации CO_2 в воздухе. Это является следствием ограничения скорости потока электронов в электрон транспортной цепи, когда скорость их отвода на CO_2 , как конечный акцептор, лимитируется его диффузией из окружающей среды.

2. «Эффект усиления» Эммерсона.

Если измерять интенсивность фотосинтеза от двух монохроматических источников света с длинами волн $\lambda_1 < 690$ нм и $\lambda_2 > 690$ нм, то она окажется в несколько раз больше, чем интенсивность фотосинтеза при свете той же мощности, но содержащем лишь одну длину волны λ_1 или λ_2 . Это объясняется тем, что для нормального протекания фотосинтеза необходимо сбалансированное возбуждение фотосистем 1 и 2. В противном случае поток электронов значительно ослабевает. «Память» «эффекта усиления» составляет примерно 1 с. Если освещать лист растения поочередно светом с λ_1 и λ_2 с интервалом меньше 1 секунды, то скорость фотосинтеза будет неотличима от скорости при одновременном облучении светом с λ_1 и λ_2 . Это время характеризует время удержания пулом пластохинонов избытка или дефицита электронов между ФС-1 и ФС-2.

3. Изменение окислительно-восстановительного состояния цитохромов b и f при освещении светом с разными длинами волн.

При освещении фотосинтетического аппарата светом с $\lambda_1 < 690$ нм спектр поглощения цитохромов изменяется так, что это соответствует их восстановлению. При освещении светом с $\lambda_2 > 690$ нм цитохромы окисляются. В рамках Z-схемы фотосинтеза этот результат очевиден. Свет с длиной волны λ_1 возбуждает преимущественно ФС-2, направляющую электроны к цитохромам, а свет с длиной волны λ_2 возбуждает в основном ФС-1, отсасывающую электроны от цитохромов. Следует отметить, что сама идея Z-схемы возникла из подобных экспериментов.

4. Эффект Кока–Жолио.

Если зелёный лист растения выдержать в темноте около часа, а затем начать освещать короткими вспышками света, то выход кислорода будет иметь следующий вид (рис. 4.12):

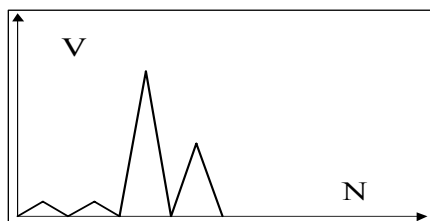
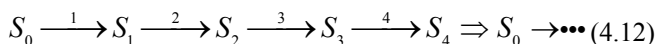


Рис. 4.12. Количество кислорода, выделяемого на одну вспышку. N — номер вспышки

На две первые вспышки кислород практически не выделяется, на третью вспышку выделение максимально, на четвёртую несколько меньше, далее серия повторяется с периодом 4, и через 20–30 вспышек модуляция сглаживается, и выделения становятся одинаковыми. Эффект объясняется дискретностью работы кислород-выделяющего комплекса (КВК). Если вспышка достаточно короткая, так что КВК успевает получить от Р680 за вспышку только одну дырку, то последовательное одноэлектронное окисление 4 Мп-кластера изменяет каждый раз суммарную валентность ионов Мп на единицу. Состояние кластера проходит ряд фаз:



Состояние S_4 спонтанно без света переходит в начальное состояние S_0 с выделением одной молекулы кислорода. При длительной адаптации к темноте устанавливается равновесное распределение всех КВК по состояниям от 0 до 4. Наибольший вес имеет состояние 1, поэтому процесс начинается с перехода № 2, и максимальный выход кислорода происходит уже после 3 вспышки. Так как не все реакционные центры получают возбуждения во время каждой вспышки, то со временем состояния различных КВК разсинхронизируются и суммарный эффект сглаживается.

5. Задержанная флуоресценция.

Время затухания собственной флуоресценции молекулы хлорофилл в разбавленных растворах, как уже отмечалось, составляет несколько наносекунд, а в зелёном листе в десятки раз меньше. В то же время вслед за этим затуханием в живом листе наблюдается слабое остаточное свечение с характерным временем затухания от нескольких секунд до минуты (это зависит от чувствительности регистрирующей аппаратуры). Парадоксальность этого явления состоит в том, что для известных типов длительной люминесценции (фосфоресценции) спектр свечения переходом из триплетного возбуждённого состояния, а в данном случае он совпадает со спектром быстро затухающего свечения (флуоресценции), и определяется релаксацией синглетного возбуждения. Происхождение этого явления обязано существованию в фотосинтетическом аппарате *межмолекулярного* переноса возбуждённого электрона и частичной обратимости этого процесса, показанной на схеме 4.11. Если разность энергии электрона на первом и ближайших к нему акцепторах не сильно отличаются от его энергии в предыдущем положении по цепи переноса, то вероятность его возврата невелика, но конечна и может в итоге привести к возврату энергии на уровень S_1 и вызвать флуоресценцию. Интенсивность и кинетика этого рекомбинационного свечения будет определяться количеством и глубиной таких электронных *ловушек*. Действительно, если в ансамбле из пар изолированных молекул, обменивающихся электронами, установилось термодинамическое равновесие, то частоты взаимного перехода электрона в паре от одной молекулы к другой одинаковы:

$$N_1 \dot{u}_1 = N_2 \dot{u}_2, \quad (4.13)$$

где N_1 и N_2 – число электронов в молекулах, \dot{u}_1 и \dot{u}_2 – вероятности прямого и обратного перехода, соответственно. В равновесии заселённости энергетических уровней связаны распределением Больцмана:

$$N_1/N_2 = \exp(-\Delta E/kT), \quad (4.14)$$

где ΔE – разность энергии электронов в 1 и 2 состоянии. Отсюда следует, что вероятности прямых и обратных переходов электрона связаны соотношением:

$$\dot{u}_2/\dot{u}_1 = \exp(-\Delta E/kT) = 10^{-\Delta E/2,3 \cdot kT} \quad (4.15)$$

При выключении достаточно сильного освещения фотосинтетического аппарата прямые переходы электрона в цепи ближайших к фотореакционному центру акцепторов относительно ослаблены, пока ранее полученные ими электроны не успели далеко продвинуться по цепи переноса. При этом распределение заселённости переносчиков близко к равновесному, и вероятность обратных переносов можно приблизительно оценить по формуле (4.15). При комнатной температуре множитель $2,3 \cdot kT \approx 60$ мЭв. Это означает, что при понижении энергии электрона на каждые 60 мЭв при переходе к ближайшему акцептору вероятность его возврата снижается всего лишь в 10 раз и может приводить к заметной величине задержанной флуоресценции. Регулируя заселённость акцепторов введением специальных химических их восстановителей или варьируя уровень светового возбуждения электронного потока, можно изменять характеристики задержанной флуоресценции. Подобные приведенным выше, но более точные расчёты позволяют определить параметры энергетического спектра цепей переносчиков в реальных фотосинтетических системах.

6. Индукция флуоресценции.

Наблюдение за квантовым выходом флуоресценции после начала освещения живого листа обнаруживает некоторое типичное изменение его во времени при постоянной освещённости (рис. 4.13.).

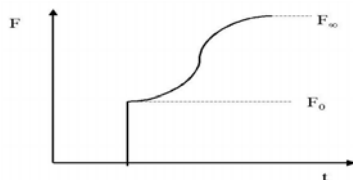


Рис. 4.13. Индукция флуоресценции: F – квантовый выход флуоресценции, t – время в масштабе долей секунды

После включения освещения практически одновременно с ним наблюдается флуоресценция с квантовым выходом F_0 . Однако через некоторое время, зависящее от интенсивности возбуждающего света, начинается рост уровня флуоресценции до нового значения квантового выхода F_∞ . В основе этого явления лежат те же процессы рекомбинации, что и в предыдущем явлении. С ростом освещённости и F_0 и возрастают, но разница $F_\infty - F_0$ уменьшается, отражая всё возрастающий уровень заполненности переносчиков электронами и увеличения вероятности обратного переноса энергии на фотореакционный центр. На больших временах поведение F становится более сложным под действием вторичных факторов. Уменьшению переменной части флуоресценции способствует также химическое заполнение переносчиков от искусственного внешнего донора. Это явление, как и предыдущее, помогает охарактеризовать энергетические параметры переносчиков.

В заключение приведём в дополнение к схеме первичных стадий фотосинтеза в высших растениях и цианобактерий (рис 4.9) более простые одноквантовые схемы первичных стадий в фотосинтезе некоторых бактерий.

У серных пурпурных бактерий всего одна фотосистема: электроны забираются из H_2S и восстанавливают НАДФН с последующим образованием сахаров, т. е. цикл переноса электронов не замкнут (рис. 4.14). Такие бактерии не выделяют кислород.

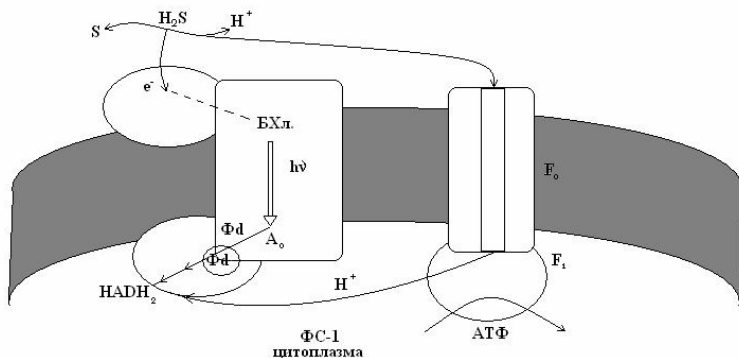


Рис. 4.14. Схема фотосинтеза в серных пурпурных бактериях. БХл – бактериохлорофилл

У некоторых несерных пурпурных бактерий фотосистема осуществляет только замкнутый цикл переноса электронов (рис. 4. 15).

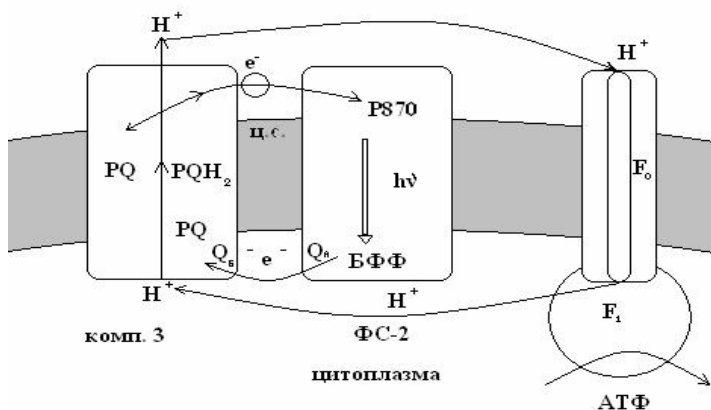


Рис. 4.15. Схема фотосинтеза в несерных пурпурных бактериях. P870 – фотореакционный центр

Отметим ещё одну интересную разновидность фотосинтеза у *солелюбивых* бактерий, которые запасают энергию непосредственно в виде

электрохимического потенциала протонов и последующего синтеза АТФ. Эта энергия необходима, в частности, для выведения из цитоплазмы ионов натрия, попадающих внутрь пассивно из-за высокой концентрации их в окружающей водной среде (рис 4.16).

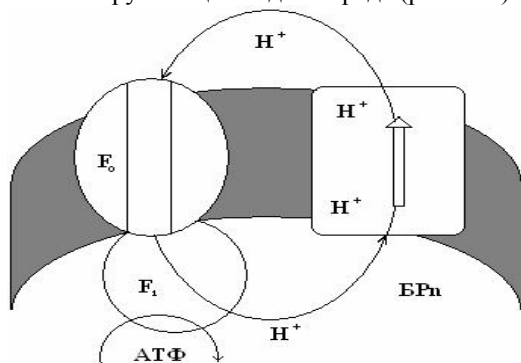


Рис. 4.16. Схема фотоцикла переноса протонов в солелюбивых бактериях. БРп – молекула бактериородопсина

В мембрану этих живых организмов встроен белок бактериородопсин (по структуре очень напоминающий родопсин, который присутствует в светочувствительных клетках человеческого глаза). Собственно белковая часть – это белок опсин с длинной полипептидной нитью, 7 раз пронизывающей мембрану. Внутри к ней одним ковалентной связью пришит ретиналь. В начальном состоянии 50 % ретиналя находится в all-trans и 50 % в 13-cis форме. На свету весь комплекс переходит в 13-cis состояние. Эта фото изомеризация приводит к изменению сродства разных сторон родопсина к ионам водорода: часть молекулы, ориентированная в периплазму (в среду снаружи от фотоактивной мембраны), высвобождает протон наружу, а часть молекулы, обращённая в цитоплазму захватывает другой протон из цитоплазмы. Посредником в этом процессе является шиффово основание (связь второго конца ретиналя с аминокислотным остатком белка – аспарагином), положение которого и его сродство к протону зависят от расположения зарядов в его окружении. Энергия конформационного напряжения в родопсине, возникающего при фотовозбуждении, затрачивается на перемещение этих зарядов и преодоление барьера для переноса протона в активном центре молекулы. Последующие перемещения протонов происходят спонтанно и приводят к созданию трансмембранного потенциала, который затем используется

для синтеза АТФ. Бактериородопсиновый фотосинтез служит хорошим примером важной роли изменений конформационных состояний белка в механизмах фотосинтеза.

5. Энергетика частных процессов в живых системах

Вооружившись пониманием общих принципов преобразования энергии в живой клетке, можно приступить к знакомству с многочисленными примерами реализации этих принципов в конкретных процессах жизнедеятельности. В сущности, все процессы, протекающие в тканях, клетках и органеллах живого организма, связаны с преобразованием энергии. В одних из них запасание энергии в удобной для хранения форме составляет главную функцию процесса (запасание лучистой энергии солнечного света в субстратной форме химической энергии в хлоропластах растительных клеток или преобразование энергии пищевого субстрата в электрохимическую энергию протонов и в химическую энергию молекул АТФ в митохондриях печени), в других – диссипация энергии направлена на выполнение специализированной функции (совершение механической работы клеткой мышцы, синтез белка в цитоплазме соматических клеток или преобразование сигналов в сенсорных клетках). В данном разделе мы рассмотрим лишь процессы, в которых изменение свободной энергии (запасание, преобразование из одного вида в другой или диссипация) является их главной функцией. Сюда можно отнести процессы переноса нейтральных и заряженных частиц (активный и пассивный транспорт, осмос), механохимические процессы, фотосинтез, термогенез, электрогенез. Процессы, в которых преобразование энергии, оставаясь движущей силой процесса, тем не менее не является главной сутью специальной функции процесса, будут рассмотрены в другой части пособия.

5.1. Перенос вещества

Перенос вещества присущ любой живой системе в силу её гетерогенности и неравновесности. Макроскопические организмы имеют специальные физиологические системы макроскопического переноса веществ (крови, лимфы, газов, слизи и т. п.). Следуя сложившейся традиции, обычно относящей эти системы к физиологии, мы не будем рассматривать их в нашем курсе и ограничимся процессами внутри- и межклеточного транспорта вещества.

В биофизике этого структурного уровня принято различать два вида транспорта: *пассивного*, когда перенос происходит за счёт градиента химического или электрохимического потенциала самого переносимого вещества, и *активного*, когда перенос осуществляется за счёт химического сродства сторонней химической реакции.

5.1.1. Пассивный транспорт

Во многих случаях биологического транспорта основой переноса веществ является их диффузия (или электродиффузия) внутри клетки и через клеточную мембрану. Способы диффузионного переноса разнообразны: диффузия жирорастворимых веществ через липидную часть мембраны, перенос гидрофильных веществ через поры, образуемые мембранными липидами и белками, облегчённая диффузия с участием специальных молекул–переносчиков, избирательный транспорт ионов через ионные каналы. Однако во всех этих случаях движущей силой процесса является поток частиц растворённого вещества и (или) растворителя в поле заданного электрохимического потенциала. Такой вид транспорта получил название *пассивного* (рис. 5.1).

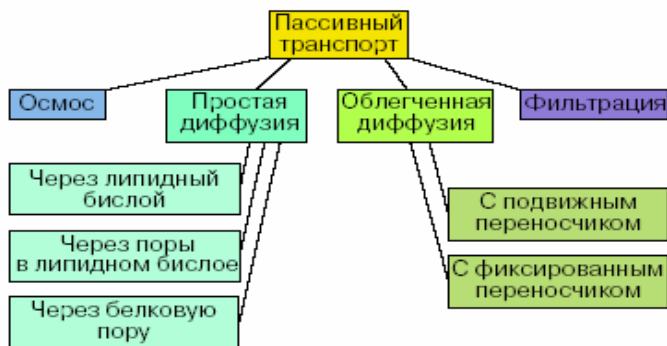


Рис. 5.1. Типы пассивного транспорта

5.1.1.1 Диффузия электронейтральных частиц

Сущность и примеры диффузионных процессов в физике хорошо известны. Однако диффузия в биологических системах имеет ряд особенностей.

Во-первых, среда живого объекта, в том числе внутриклеточная, чрезвычайно гетерогенна и, как правило, разделена материальными границами (мембранами) с различной проницаемостью. Это значительно усложняет математический аспект проблемы, т. к. требует учёта многочисленных граничных условий.

Во-вторых, часто среда бывает химически активна по отношению к диффундирующему веществу, и это требует внесения в уравнения диффузии характеристик «источников». Мощность реальных источников не является постоянной, и учёт этого обстоятельства вносит дополнительные осложнения.

В-третьих, на масштабах внутриклеточных органелл и компартментов проявляется дискретность материала среды, а значит, величина коэффициента диффузии требует определённых усреднений и становится весьма условной.

Наконец, перенос вещества через границу раздела сред часто осуществляется либо по специальным каналам, пронизывающих мембрану, либо посредством специальных переносчиков. При этом коэффициенты проницаемости могут зависеть от концентрации переносимого вещества и величины потока через мембрану. Пример мембраны с грамицидиновым каналом приведен на рис. 5.2.

Грамицидиновый канал диаметром около 0,4 нм образован внутренним просветом двух полипептидных спиралей L и D типов по 15 аминокислотных остатков в каждой. Его проницаемость особенно велика для ионов H^+ и достигает величин, характерных для водной среды. Грамицидин, сильно модифицируя свойства мембраны, способен лишать жизнеспособности некоторые

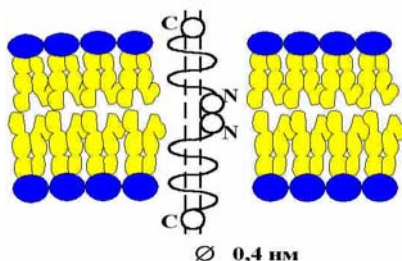


Рис. 5.2. Мембрана, пронизанная грамицидиновым каналом

виды клеток. Поэтому это искусственное соединение используется в качестве антибиотика. По такому же принципу устроены и некоторые природные каналы. В связи с узостью канала у некоторых из них проявляется важная особенность переноса: дискретность переноса. Часто частица не может войти в канал, пока его не покинет предыдущая частица. Поэтому поток вещества через такие мембраны носит прерывистый дискретный характер. Математическое описание потока через такие мембраны с малым числом каналов требует использования статистических методов. Однако такие каналы могут легко управляться, что часто успешно используется живой клеткой. С типами управляемых каналов мы познакомимся позже.

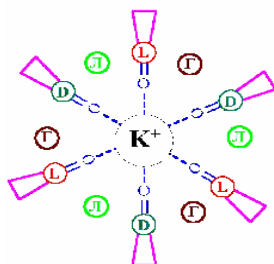


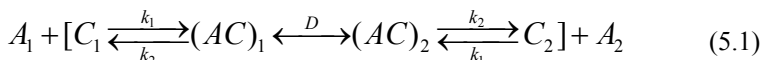
Рис. 5.3. Молекула валиномицина – подвижный переносчик катионов через мембрану. Л – лактат, D – D-валин, L – L-валин, Г – гидроксизовалериановая кислота

Пример мембранного переносчика приведен на рис. 5.3. Валиномицин – также известный антибиотик. Полость этой молекулы хорошо поляризуется и сильно снижает электростатическую энергию иона, в то время как её наружная поверхность неполярна и легко встраивается в неполярную среду липидной мембраны. Эта ситуация особенно благоприятна для иона K^+ .

Проницаемость мембраны с этим переносчиком для ионов калия на три порядка превышает её проницаемость для ионов натрия. Валиномицин широко используется в экспериментальной биофизике и практической медицине.

Отметим также свою особенность, присущую облегчённой диффузии с подвижным переносчиком. В этом случае, вообще говоря,

коэффициент проницаемости может зависеть от концентрации диффундирующего вещества. Очевидно, что если концентрация переносчика и скорость его перемещения в мембране невелики, то с ростом концентрации переносимого вещества должно наступать насыщение скорости облегчённого переноса и соответственно снижение коэффициента проницаемости. Проверим это ожидание с помощью простой модели явления:



Здесь A_1 и A_2 – концентрации переносимого вещества вне мембраны, C_1 и C_2 – концентрации переносчика в мембране у левой и правой стенок, соответственно. Коэффициенты k_1 и k_2 – константы скоростей образования и распада комплекса. Стадия D – диффузия комплекса в мембране. Пусть общая концентрация свободного и занятого переносчика равна $C_0 = C_1 + (AC)_1 = C_2 + (AC)_2$ -. Тогда, если $D \ll k_1$:

$$\kappa_1 A_1 C_1 = \kappa_1 A_1 [C_0 - (AC)_1] = \kappa_2 (AC)_1 \quad (5.2.)$$

Отсюда

$$(AC)_1 = \kappa_1 A_1 C_0 (\kappa_2 + \kappa_1 A_1)^{-1} = A_1 C_0 (K + A_1)^{-1}, \text{ где } K = \kappa_2 / \kappa_1 \quad (5.3.)$$

По определению (И. Ньютон) коэффициент проницаемости мембраны это коэффициент пропорциональности между плотностью потока и разностью концентрации вещества по обе стороны мембраны. Тогда:

$$J_A = J_{AC} \equiv p_A (A_1 - A_2) \equiv p_{AC} [(AC)_1 - (AC)_2] = p_{AC} [A_1 C_0 (K + A_1)^{-1} - A_2 C_0 (K + A_2)^{-1}] \quad (5.4.)$$

Если перепад концентрации вещества достаточно большой, так что $A_2 \ll A_1$, то из (5.4.) получим:

$$p_A A_1 = p_{AC} A_1 C_0 (K + A_1)^{-1} \quad (5.5.)$$

Отсюда получаем, наконец, для коэффициента проницаемости вещества через мембрану:

$$p_A = p_{AC} C_0 (K + A_1)^{-1}. \quad (5.6.)$$

График этой зависимости приведен на рис. 5.4.

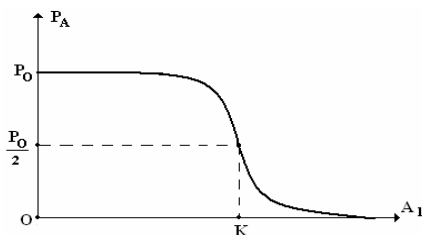


Рис. 5.4. Зависимость коэффициента проницаемости мембраны с переносчиком от концентрации переносимого вещества.

Действительно, с увеличением концентрации вещества A коэффициент p_A начинает снижаться при приближении концентрации к величине K . В рамках модели это снижение происходит до 0, на самом деле оно стремится к коэффициенту проницаемости *без* переносчика.

Не забывая об указанных особенностях диффузионного переноса в реальных биологических структурах, напомним о математической постановке задачи. Распределение концентрации и потоков вещества определяется уравнением диффузии

$$\partial C / \partial t = D \Delta C + g \quad (5.7.)$$

и граничными условиями для концентрации и потоков. В уравнении (5.7.): Δ – оператор Лапласа, C – концентрация вещества, D – коэффициент его диффузии, g – локальная мощность источника, которая может быть как положительной, так и отрицательной, а также может быть функцией времени и координат. Объем среды с вышеуказанными оговорками можно характеризовать коэффициентом диффузии, а плотность потока в нём выражать как $j = -D \text{ grad } C$. Поток вещества через мембрану можно характеризовать эмпирическим коэффициентом проницаемости (p). Вслед за И. Ньютоном примем, что плотность потока вещества (j) через мембрану пропорциональна разности концентраций вещества в растворе по обе стороны мембраны:

$$j = p (C_1 - C_2) \quad (5.8.)$$

Часто в таких задачах мембрану можно считать бесконечно тонкой. Если мембрана инертна по отношению к диффундирующему веществу, то поток через границу раздела сред непрерывен. Этого нельзя сказать о концентрации вещества. Если величина p конечна, то наличие потока через мембрану, предполагает разрыв C на границе, как это следует из формулы (5.8). Решение нестационарного уравнения (5.7) для реальной геометрии системы может оказаться весьма сложным. В то же время, решение даже сильно упрощённых задач часто бывает полезным, т. к. помогает разобраться хотя бы полуколичественно в сущности сложных явлений, наблюдаемых в реальных условиях. Рассмотрим для примера такую ситуацию. Пусть в водной среде находится суспензия клеток, потребляющих кислород с постоянной удельной мощностью. В данном случае $g = -g_0 < 0$. Найдём стационарное распределение концентрации кислорода внутри клетки и вне неё, если на большом удалении от клетки она задана и равна C_0 . Будем считать клетки сферическими с радиусом R и сильно удалёнными друг от друга. Задача для одной клетки в данном случае имеет сферическую симметрию, а уравнение (5.7) приобретает вид

$$D_i [d^2 C_i / dr^2 + (2/r) dC_i / dr] - g_0 = 0 \quad \text{при } r < R \quad (5.9.)$$

$$d^2 C_e / dr^2 + (2/r) dC_e / dr = 0 \quad \text{при } r > R \quad (5.10.)$$

Здесь D_i и D_e – коэффициенты диффузии кислорода внутри клетки и снаружи, соответственно.

Полное решение внутри

$$C_i = A + B/r + (g_0)/6D_i r^2, \quad (5.11)$$

Снаружи:

$$C_e = A_1 + B_2 / r, \quad (5.12)$$

Граничные условия:

$$\text{при } r = R: j = -D_i dC_i / dr = -D_e dC_e / dr = p (C_i - C_e) \quad (5.13.)$$

$$\text{при } r \rightarrow \infty \quad C_e \rightarrow C_0, \quad \text{при } r = 0 \quad C_i \text{ ограничено.} \quad (5.14.)$$

С учетом этих условий находим константы и получаем решение задачи:

$$C_i(r) = C_0 - g_0 R/3p + g_0 (R^2 - r^2)/6D_i \quad (5.15)$$

$$C_e(r) = C_0 - (g_0 R^3/3D_e) r^{-1} \quad (5.16.)$$

График этого решения приведен на рис. 5.5.

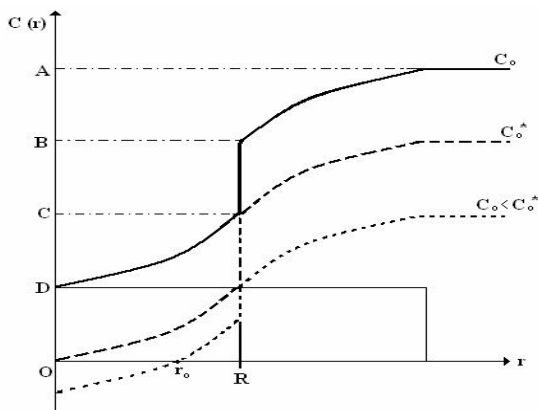


Рис. 5.5 Распределение концентрации кислорода в стационарном случае для различных значений C_0

Полученная зависимость имеет прозрачный физический смысл: наружный перепад концентрации (отрезок AB) равен $g_0 R^2/3D_e$ и исчезает при $D_e \rightarrow \infty$, внутренний перепад (отрезок CD), равный $g_0 R^2/6D_i$, исчезает при $D_i \rightarrow \infty$, перепад на границе клетки, равный $g_0 R/3p$, исчезает при $p \rightarrow \infty$. Любопытно поведение решения при снижении C_0 . При $C_0 = C_0^* = g_0 R/3 (1/p + R^2/D_i + R/D_e)$ C в точке $r = 0$ обращается в 0, т. е. кислород едва достигает центра клетки. При дальнейшем снижении его концентрации во внешней среде в центре клетки образуется область “ишемии”. Конечно, формальное решение внутри становится некорректным: концентрация (кривая обозначена точками на рис. 5.5) не может быть отрицательной! Это обусловлено некорректностью условия задачи в данном случае: нельзя потреблять то, чего не существует. Чтобы обойти эту неприятность нужно сформулировать граничные условия внутри клетки иным образом. А именно, вместо условия конечности концентрации в центре принять, что существует точка r_0 , в которой C_i и dC_i/dr обращаются в 0, а при $r < r_0$ $g_0 = 0$.

Возникновение области «ишемии» означает, что при снижении концентрации кислорода в среде ниже C_0^* поглощение кислорода клеткой начнёт падать. Это критическое значение легко определяется экспериментально, и по нему можно *вычислить* значение коэффициента проницаемости мембраны, если остальные параметры известны:

$$p = (3C_0^*/g_0 R - R/2D_i - R/D_e)^{-1}. \quad (5.17)$$

Измерить этот параметр непосредственно очень трудно.

5.1.1.2 Пассивный транспорт заряженных частиц.

Указанные особенности поведения транспортных процессов в биологическом объекте усложняются, если частицы переносимого вещество имеют электрический заряд. Сложное пространственное распределение электрических полей в биологической среде делает чрезвычайно трудным их точный расчёт и правильное использование при исследовании переноса заряженных частиц. А поскольку большинство участников переноса и химических реакций имеют заряд, то важность этого обстоятельства трудно переоценить. В этих обстоятельствах важно уметь делать общую оценку ситуации и необходимые упрощения. Подробный анализ различных ситуаций, складывающихся в живых объектах при протекании внутренних процессов и при воздействии внешних электромагнитных полей и излучений является предметом специальных работ и не входит в задачи нашего повествования. Мы продемонстрируем этот подход лишь на некоторых простых примерах, предоставляя возможность читателю самому углубляться в исследование других конкретных задач электродиффузии.

В основе подхода к решению теоретических задач перемещения заряженных частиц лежит использование фундаментального закона сохранения вещества, известного ещё как соотношение непрерывности потока:

$$\partial n / \partial t = g - \operatorname{div} j \quad (5.18)$$

Здесь n – концентрация свободных носителей заряда, g – удельная скорость их возникновения (или гибели) за счёт генерации (или рекомбинации), j – вектор плотности их потока. В свою очередь

$$j = u n E - D \operatorname{grad} n, \quad (5.19)$$

где первый член в этом векторном уравнении обусловлен дрейфом частиц в электрическом поле E (u – подвижность частиц), а второй член отражает их диффузию. Ограничимся простейшим случаем стационарного состояния, когда все характеристики не зависят от времени, и кроме того пренебрежём генерацией и рекомбинацией частиц. Это приближение хорошо описывает установившийся поток и распределение зарядов в постоянном или медленно меняющемся электрическом поле. Для решения этой казалось бы простой задачи нужно задать граничные условия. И здесь кроется очередная сложность: если в разных участках системы носителями тока являются физически различные частицы, то нужно конкретизировать электрохимический характер передачи заряда через границы раздела участков системы. Поэтому сделаем очередное упрощение задачи: будем считать, что смены типа частиц при их переходе через границу не происходит. Это означает, что поток их в пространстве постоянен ($\text{div} j = 0$), а значит, $g = 0$. В качестве конкретного примера рассмотрим простой, но поучительный случай одномерной системы. Пусть плоский слой электропроводящей среды помещён в изолятор, в котором поддерживается постоянное электрическое поле с напряжённостью E_0 , перпендикулярной границе раздела, которая непроницаема для подвижных зарядов (рис.5.6).

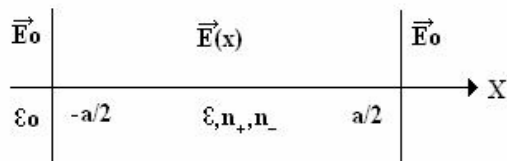


Рис 5.6. Плоский проводящий слой в постоянном электрическом поле

Пусть диэлектрическая постоянная наружного изолятора – ϵ_0 , проводящего слоя – ϵ , а его электропроводность обусловлена положительными частицами с концентрацией n_+ и подвижностью u_+ и отрицательными частицами с концентрацией n_- и подвижностью u_- , а толщина слоя равна $2a$. В принятых допущениях уравнение (5.19) упрощается до вида

$$u_+ n_+ E(x) - D_+ \frac{dn_+(x)}{dx} = 0 \quad (5.20)$$

$$-u_- n_- E(x) - D_- \frac{dn_-(x)}{dx} = 0 \quad (5.21)$$

Заметим, что в этих уравнениях заряд в явном виде не присутствует, т. к. они описывают не электрический ток, а плотность потока частиц, и заряд отражается только на знаке подвижности в первом члене второго уравнения. Используем соотношение Эйнштейна между коэффициентом диффузии и подвижностью:

$$Dq = ukT \quad (5.22)$$

Здесь q – величина заряда частицы, k – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура. Подстановка этого соотношения в уравнения (5.20) и (5.21) и сокращение их на не равные нулю u_+ и u_- , упрощает уравнения:

$$(kT/q) dn_+/dx - n_+ E = 0 \quad (5.23)$$

$$(kT/q) dn_-/dx + n_- E = 0 \quad (5.24)$$

Для отыскания трёх неизвестных функций необходимы три уравнения. Систему (5.23) и (5.24) дополнит уравнение Пуассона:

$$dE/dx = (4\pi q/\varepsilon) (n_+ - n_-) \quad (5.25)$$

Вычтем из уравнения (5.23) уравнение (5.24):

$$(kT/q) d(n_+ - n_-)/dx - (n_+ + n_-)E = 0 \quad (5.26)$$

Продифференцируем по x обе части уравнения (5.25) и, подставив из него выражение для $d(n_+ - n_-)/dx$ в (5.26), получим:

$$d^2E/dx^2 - \chi^2 E = 0, \quad \text{где } \chi^2 = (8\pi q^2 n_0 / \varepsilon kT) \quad (5.27)$$

Здесь мы учли, что в силу пространственной симметрии системы $n_+(x) + n_-(x) = 2n_0$, где n_0 – концентрация свободных носителей заряда каждого знака до приложения поля. Уравнение (5.27) легко решается:

$$E(x) = A \sinh \chi x + B \cosh \chi x \quad (5.28.)$$

Постоянные A и B находятся из условия непрерывности вектора электрической индукции на границах раздела:

$$\varepsilon_0 E_0 = \varepsilon E(-a) = \varepsilon E(a) \quad (5.29.)$$

Из симметрии этих условий следует, что $A = 0$, а для $E(x)$ получаем:

$$E(x) = (\varepsilon_0 E_0 / \varepsilon) \operatorname{ch} \chi x / \operatorname{ch} \chi a \quad (5.30)$$

Вид этого решения для разных значений χa приведен на рис. 5.7а. Распределение плотности объёмного заряда $\rho(x) = (n_+ - n_-)$ находится из уравнения Пуассона:

$$\rho(x) = (4\pi/\varepsilon) = -(\chi \varepsilon_0 / 4\pi) \operatorname{sh} \chi x / \operatorname{sh} \chi a \quad (5.31)$$

Графики этой зависимости приведены на рис 5.7.б. Распределение потенциала $\varphi(x)$ находится из уравнения $E = -d\varphi/dx$. Предоставляем читателю самому решить это уравнение. Результат изображён на рис 5.7.в.

а. б. в.

Рис. 5.7. Зависимость вида полученных решений $E(x)$, $\rho(x)$, $\varphi(x)$ при разных значениях $\chi a = a/\delta$: пунктир – $a \ll \delta$, сплошная линия – $a \approx \delta$, штрихпунктир – $a \gg \delta$.

Вид всех графиков принципиально зависит от значения константы χ , точнее от значения величины χa . Величина χ^{-1} имеет размерность см и носит название “дебаевская длина” (δ):

$$\chi^{-1} = \delta = (\varepsilon k T / 8\pi n_0 q^2)^{1/2} \quad (5.32.)$$

Следовательно, $\chi a = a/\delta$. Эта безразмерная величина - важнейший параметр задачи. Оценим величину δ . При комнатной температуре и при $\varepsilon = 80$ (водная среда), $n = 10^{20} \text{ см}^{-3}$ (раствор солей с концентрацией ионов 150 мМ) $\delta = 0,75 \text{ нм}$. При $\varepsilon = 5$, $n = 10^{16} \text{ см}^{-3}$ (липидная мембрана или, грубо, внутренний объём белка), $\delta = 20 \text{ нм}$. Значит, в первом случае, если он относится к цитоплазме клетки или к внутренности её крупного компартмента, $\delta \ll a$, электрическое поле и объёмный

заряд сосредоточиваются лишь в относительно тонком слое у границ раздела, а в объёме системы поля нет, и даже заряженные частицы в этой области не испытывают воздействия внешнего электрического поля. Иное дело – во втором случае. Здесь $\delta \gg a$, и внешнее поле практически не ослабляется объёмным зарядом и мало отличается от случая поля в изоляторе $[E = (\epsilon_0/\epsilon) E_0]$. В промежуточных случаях, когда дебаевская длина соизмерима с размерами системы (внутренняя полость тилакоида или митохондрии) необходимо учитывать неравномерность поля внутри системы. Разница в этих случаях отражена на рис. 5.7.

Полученный результат даёт алгоритм действий при изучении сложной системы. Прежде всего, нужно оценить дебаевскую длину во всех частях изучаемой системы. В общем случае удобнее пользоваться вместо формулы (5.32) её модифицированным вариантом:

$$\delta = [\epsilon k T / 4\pi (n_{+0} + n_{-0}) q^2]^{1/2}, \quad (5.33)$$

в котором $2n_0$ заменено на $n_{+0} + n_{-0}$. Если подвижны носители обоих знаков и концентрации их равны, как в разобранным случае, то формула (5.33) возвращается к виду (5.32). Однако концентрации *подвижных* зарядов разных знаков могут быть и не равны друг другу, несмотря на электронейтральность среды, например, когда подвижные заряды возникают при диссоциации крупного биополимера, который сам остаётся неподвижным. Оценка величины δ для подсистемы позволяет понять ситуацию с распределением электрического поля в ней. При $\delta_i \ll a_i$ поле внутри объёма подсистемы отсутствует, а объёмный заряд ограничен приповерхностной областью, в случае $\delta_i \gg a_i$ поле внутри i -й области однородно и определяется как поле в диэлектрике. И лишь для областей, где $\delta_i \approx a_i$ требуется строгое решение электродиффузионных уравнений. Напомним, однако, что эти выводы справедливы только для постоянных и медленно меняющихся полей. Для быстроменяющихся электрических полей заряды не успевают перемещаться вслед за полем, и экранирующий эффект объёмного (или поверхностного) заряда не влияет на поле внутри системы. Когда n_0 мало ($\delta \gg a$) характерное время перемещения зарядов – это время диффузии на расстояние a (т. е. время порядка a^2/D). Если n_0 велико, то время перемещения – это время зарядки ёмкости единичного объёма среды через её внутреннее сопротивление (т. е. «максвелловское» время порядка $\epsilon/4\pi\sigma$, где σ – удельная электропроводность материала, равная $u_{+}n_{+}q_{+} + u_{-}n_{-}q_{-}$). Поэтому мера величины скорости изменения электрического поля это сопоставление периода вариации

поля с характерным временем установления равновесной поляризации объема среды. Для низкочастотных (в этом смысле) полей распределение зарядов и поля в объеме среды близко к стационарному, полученному нами в простой модели. Для высокочастотных полей объемной поляризации не возникает, а поле внутри приближается к однородному. Поэтому умение правильно оценить величины дебаевских длин и характерных времён поляризации в частях системы позволяет значительно упростить задачу исследования сложной системы.

Рассмотрим ещё один важный пример переноса заряженных частиц.

Вновь воспользуемся уравнением Нернста – Планка для электродиффузии

$$j = unE - D \frac{dn}{dx} \quad (5.34)$$

В данном стационарном случае плотность потока постоянна и не зависит от x . Выразим электрическое поле через разность потенциалов: $E = -\Delta\phi/h$, и используем соотношение Эйнштейна (5.34). Преобразуем уравнение (5.35)

$$dx = \frac{Ddn}{\frac{DqEn}{kT} - j} \quad (5.35)$$

Проинтегрируем это уравнение по толщине мембраны: по x от 0 до h , по n от n'_1 до n'_2 . Это даст

$$h = \frac{kT}{qE} \ln \frac{j - \frac{DqEn'_2}{kT}}{j - \frac{DqEn'_1}{kT}} \quad (5.36)$$

и пропотенцируем его:

$$e^{-\psi} = \frac{j - \frac{DqEn'_2}{kT}}{j - \frac{DqEn'_1}{kT}} \quad (5.37)$$

где введен безразмерный потенциал: $\psi = \Delta\phi q/kT$. Вводя коэффициент распределения $K = n'/n$, из последнего уравнения легко получить выражение для плотности потока

$$j = -p\psi \frac{n_1 - n_2 e^\psi}{1 - e^\psi} \quad (5.38.)$$

Здесь

$$p = KD/h \quad (5.39.)$$

Выражение (5.37) является решением задачи. Его сложный вид является следствием достаточной общности постановки задачи. Посмотрим, насколько правильно оно описывает известные частные случаи.

1. Пусть электрическое поле уменьшается и становится несущественным. Это означает, что $\psi \rightarrow 0$. При этом в числителе (5.38) $e^\psi \approx 1$, а в знаменателе требуется разложение в ряд по ψ . После этого решение превращается в

$$j = p(n_1 - n_2) \quad (5.40)$$

Это закон Ньютона для диффузионного потока через мембрану, а p — знакомый коэффициент проницаемости мембраны. Формула (5.39) проясняет физический смысл этого эмпирического коэффициента.

2. Раскрывая значение p и переходя к внутренним концентрациям, получим из (5.40)

$$j = D (n'_1 - n'_2)/h \equiv -D \text{grad } n' \quad (5.41)$$

Это закон Фика для диффузии внутри мембраны.

3. Пусть теперь, наоборот, разность концентраций начинает уменьшаться, т. е. $n_1 \rightarrow n_2$. Тогда из (5.38) получим

$$j = p\psi n = (KD/h) \psi n = u E n \quad (5.42)$$

Если умножить обе части равенства на заряд частицы q , то получим закон Ома для плотности электрического тока.

4. Правую часть выражения (5.38) можно представить как разницу двух потоков в противоположные стороны: $j = j_1 - j_2$. При этом

$$j_1/j_2 = (n_1/n_2)e^{-\psi} \quad (5.43)$$

Это закон Усинга для отношения парциальных потоков частиц в электрическом поле.

5. В условиях термодинамического равновесия $j_1 = j_2$, а значит

$$n_2 = n_1 e^{-\psi} \quad (5.44)$$

Это закон Больцмана для равновесного распределения заряженных частиц в поле электрического потенциала.

6. Наконец, прологарифмировав выражение (5.44), получим:

$$\psi = \ln(n_1/n_2) \text{ или } \Delta\varphi = (kT/q) \ln(n_1/n_2) \quad (5.45)$$

Это закон Нернста для равновесного электрического потенциала в диффузионном поле.

В заключение, наконец, заметим, что уравнение электродиффузии можно записать в другом виде:

$$J = -u n \, d\varphi/dx - D \, dn/dx = -u n \, [d\varphi/dx + (kT/q) \, dn/dx] \equiv -u n \, d\mu^*/dx, \quad (5.46.)$$

где μ^* электрохимический потенциал:

$$\mu^* = \mu_0^* + \varphi + (kT/q) \ln n \quad (5.47)$$

Это полезное обобщение уравнения (5.34).

5.1.2. Активный транспорт

В процессе эволюции живая клетка создала особый способ переноса, получивший название *активного транспорта*. В этом случае перенос вещества идёт против перепада концентрации или против сил электрического поля и поэтому сопряжён с использованием энергии, источником которой чаще всего служит молекула АТФ. Физическим алгоритмом отнесения транспорта к пассивному является возможность описания плотности потока J с помощью уравнения электродиффузии:

$$J = -n \cdot u \cdot \text{grad } \varphi - D \, \text{grad } n = -n \cdot u \, \text{grad } \mu^*, \quad (5.48)$$

где n – концентрация частиц, u – их подвижность, φ – электрический потенциал, D – коэффициент диффузии ($eD = ukT$), $\mu^* = \varphi + kT \ln n$ – электрохимический потенциал. Если этого соотношения недостаточно и необходимо учитывать некую «третью силу», т. е. добавить в правую часть уравнения (5.48) вклад химического сродства в виде LA , то это явный признак *активного транспорта*, т.е. присутствия некоего

химического «насоса». При этом перенос осуществляется специальным сопрягающим белковым комплексом, ферментом, получившим название транспортная АТФ.

Исследования показали, что в биологических мембранах имеется несколько разновидностей таких насосов – специальных систем интегральных белков – транспортных АТФ-аз. Можно указать общие характерные феноменологические признаки наличия такого бионасоса.

1. Вещество переносится против градиента электрохимического потенциала или не в полном соответствии с ним (см. формулу 5.48.)
2. Поток вещества сопряжён с гидролизом АТФ (или другого источника энергии).
3. Работоспособность насоса зависит от температуры.
4. Транспортная машина встроена в мембрану асимметрично.
5. Насос *in vitro* способен гидролизовать АТФ только в присутствии тех частиц, которые он переносит *in vivo*.
6. При встраивании насоса в искусственную мембрану он способен сохранять свою характерную селективность.

Трансмембранный перенос некоторых важных ионов также относится к активному типу и происходит вследствие сопряжения процессов транспорта с химическими реакциями за счёт энергии метаболизма клеток. В настоящее время известны 3 типа электрогенных ионных насосов: Na^+ , K^+ -АТФ-аза, Ca^{++} -АТФ-аза и протонная помпа – H^+ -АТФ-аза. Этот перенос относят к *первичному* активному транспорту (рис.5. 7).

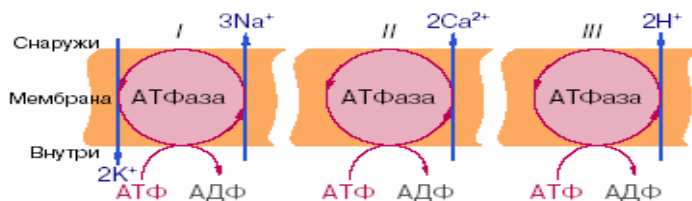


Рис. 5.7. Первичный активный перенос ионов транспортными АТФ-азами. I – схема K^+ , Na^+ насоса в клеточной плазматической мембране; II – схема кальциевого насоса в мембране саркоплазматического ретикулула; III – схема протонного насоса во внутренней мембране митохондрий

Ко *вторичному* (или сопряжённому) типу активного транспорта относят случаи переноса частиц, когда движущая сила переноса создаётся в виде разности концентрации или электрического потенциала в результате *первичного* активного транспорта других частиц (или ионов). В настоящее время различают три схемы вторичного транспорта (рис. 5.8). Это – односторонний перенос частиц в комплексе со специфическим переносчиком, который получил название *унипорта*. При этом через мембрану переносится заряд либо

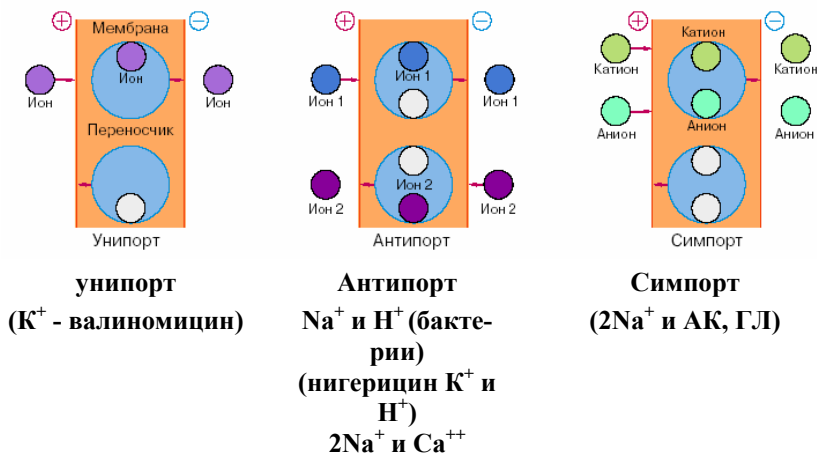


Рис. 5. 8. Вторичный (сопряжённый) активный транспорт.

комплексом, если молекула переносчика электронейтральна, либо пустым переносчиком, если переносчик имеет заряд. Движущей силой ионного транспорта служит электрическое поле, т.е. разность потенциалов на мембране, созданная в результате первичного транспорта ионов. Второй механизм сопряжённого переноса ионов – это *антипорт*, при котором перенос одного иона через мембрану происходит одновременно с переносом второго иона того же заряда в противоположном направлении. Совместный односторонний перенос ионов с участием «двухместного» переносчика называется *симпортом*. По схеме симпорта, например, происходит доставка и накопление клетками аминокислот и глюкозы.

5.1.2.1. Натрий-калиевый насос

Для всех ионных насосов характерны три обязательных стадии: 1) захват одного типа ионов или их обмен на другой тип на одной

стороне мембраны, 2) перенос их на другую сторону мембраны и 3) выделение ионов или обмен их на другой тип на противоположной стороне мембраны. Самым популярным примером первичного активного транспорта является трансмембранный перенос ионов натрия и калия против их электрохимических потенциалов, осуществляемый Na^+/K^+ -насосом за счёт энергии гидролиза АТФ. Ступени работы насоса и стехиометрия процесса показана на рис. 5.7. При работе Na^+/K^+ -АТФазы за счёт энергии гидролиза одной молекулы АТФ в клетку переносятся 2 иона калия и одновременно из клетки выкачиваются 3 иона натрия. Таким образом, создаётся повышенная по сравнению с межклеточной средой концентрация в клетке ионов калия и пониженная – ионов натрия, что имеет важное физиологическое значение. Этими насосами в большом количестве располагают клетки почти всех живых организмов. Они создают неравновесный, но стационарный трансмембранный перепад концентрации ионов натрия и калия, характерный для живой клетки.

Na^+/K^+ -АТФ была одним из первых мембранных ферментов, выделенных из клеточных мембран в активном состоянии. Известно, что этот фермент состоит из двух полипептидных цепей: α и β (рис. 5.9). Большая из них (α -субъединица) содержит α -спиральные участки, которые как «колонны» пересекают мембрану 10 раз. Фрагменты полипептидной цепи, расположенные между 2-й и 3-й, а также между 4-й и 5-й α -спиралями, являются достаточно протяжёнными. Первый из них содержит центр для переносимых ионов (ионсвязывающий центр), а второй – центр, в котором осуществляется связывание и гидролиз АТФ (активный центр, обращённый в цитоплазму). Меньший по размерам полипептид (β -субъединица), который встраивается в мембрану одновременно с α -субъединицей, непосредственно не участвует в работе фермента, но, вероятно, обеспечивает правильную ориентацию его в мембране. Комплекс ($\alpha + \beta$) представляет собой функциональную единицу (*протомер*) Na^+/K^+ -насоса. Насос способен гидролизовать АТФ и выполнять свою функцию только при агрегации 4 протомеров в одну функциональную единицу. Одиночный протомер не способен гидролизовать АТФ, но может гидролизовать ГТФ. Na^+/K^+ -АТФ-аза работает как циклическая молекулярная машина.

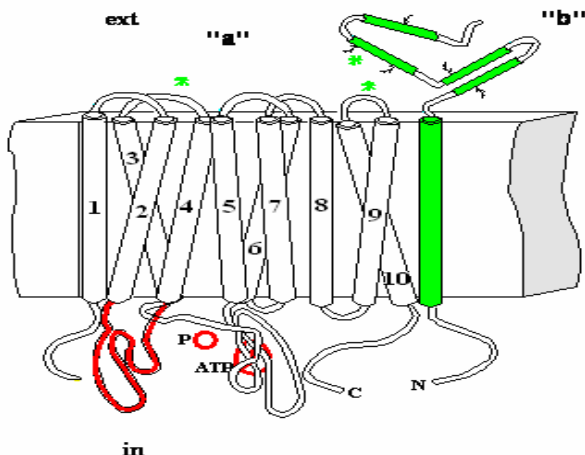


Рис. 5.9. Схема укладки в мембране полипептидной цепи Na-K-АТФ-азы. *a* – α -субъединица, *b* – β -субъединица.

Рассмотрим гидролитический цикл фермента, начиная со стадии взаимодействия белка с Na^+ . «Натриевая конформация» (Na-конформер) обозначается E_1 . «Калиевая конформация» (K-конформер) обозначается как E_2 . Взаимодействие Na-конформера с АТФ приводит к образованию фермент-субстратного комплекса, в котором натрий активирует перенос терминальной фосфатной группы АТФ на карбоксил аспарагинового остатка белка, приводящий к образованию *фосфофермента*, обозначаемого $E_1 \sim \Phi$, где E_1^* – молекула белка-фермента, а Φ – фосфатная группа. Гидролиз связи $E_2 \sim \Phi$ активируется ионами калия. Схематически весь процесс выглядит следующим образом:

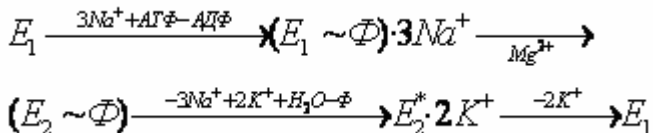


Рис. 5.10

1. Когда фермент находится в состоянии E_1 , он способен взаимодействовать с Na^+ и АТФ с внутренней стороны мембраны. В результате фосфорилирования молекулы образуется энергетически возбуждённое состояние $E_1 \sim \Phi$, а АДФ высвобождается из активного центра и возвращается в цитоплазму.
2. Фосфорилированный белок переходит в состояние, при котором ионы натрия не способны высвободиться ни с внутренней, ни с внешней стороны мембраны, они недоступны для обмена.
3. Переход фермента в следующую стадию активируется ионами Mg^{2+} . Они ускоряют переход фосфорилированного фермента из E_1 в E_2 . Эта стадия затрачивает часть избыточной энергии комплекса и состоит в перемещении через мембрану отдельных частей белковой глобулы, связанных с ионами Na^+ . Таким образом, перенос Na^+ через мембрану осуществляется синхронно с конформационным переходом $E_1 \rightarrow E_2$. Вследствие этого перехода центр связывания ионов становится более гидрофобным, и ионы натрия диссоциируют от фермента по другую сторону мембраны, где с этим же центром связываются ионы калия.
4. K^+ подвергается такой же окклюзии, что и Na^+ , и сохраняется в комплексе с ферментом в ходе последующего переноса его через мембрану. Комплекс $E_2 \sim \Phi$ отличается тем, что Φ становится доступен для атаки молекулой воды. Происходит гидролиз $E_2 \sim \Phi$ и высвобождение неорганического фосфата во внутриклеточную среду, а за счёт энергии этого процесса происходит конформационный переход в ферменте с переносом 2 ионов калия в цитоплазму.
5. После этого состояние связанных ионов K^+ становится неустойчивым и они диссоциируют из центров связывания, высвобождаясь в цитоплазму. Их место занимает Na^+ . Последняя стадия цикла одновременно подготавливает фермент для возвращения в исходное состояние и для начала нового цикла.

Так происходит активный транспорт Na^+ из клеток и K^+ – в клетки, а энергия АТФ тратится не непосредственно на перенос ионов, а на принудительное изменение конформации ферментного комплекса. Перенос ионов натрия и калия осуществляется одним и тем же ионным центром фермента, последовательно изменяющим своё сродство к переносимым ионам одновременно с изменением конформации белка. Главный вопрос – как представить себе изменение сродства центра связывания к K^+ и Na^+ . Этот центр расположен в петле между 2-й и 3-й α -субъединицами фермента. Взаимодействие ионов с этим центром обеспечивается координационными связями с атомами ки-

слорода карбоксильных групп аспарагиновой и глутаминовой аминокислот. Кислород способен осуществлять координационные взаимодействия с лигандами, образуя решётку двух типов. В одном случае образуется более рыхлая и доступная для молекул воды структура, в другом – реализуется более плотная упаковка. Это обстоятельство и используется здесь. Дело в том, что при физиологических температурах ионы натрия легко гидратируются, а ионы калия, наоборот, избегают гидратации. Ионы натрия легко входят в решётку первого типа, и её размер позволяет связать 3 иона натрия, а ионам калия не выгодно там находиться. Зато в решётке второго типа ситуация обратная: в её безводной полости с «удовольствием» размещаются ионы калия, однако она вмещает лишь два иона. Этим и объясняется тот факт, что при гидролизе *одной* молекулы АТФ фермент обменивает *три* иона натрия на *два* иона калия. Предполагаемая структура этих решёток показана на рис. 5. 11. Там же приведена схема участка полипептидной петли, который в процессе конформационного перехода $E_1 \rightarrow E_2$ меняет свою геометрию, осуществляя трансмембранный перенос ионов.

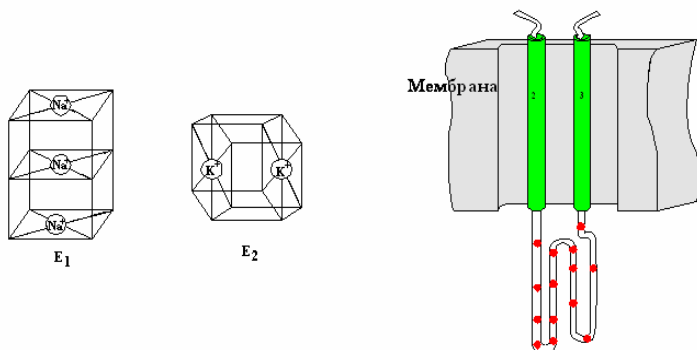


Рис. 5.11. Гипотетические формы центра связывания ионов К и Na и конформационно подвижной полипептидной петли. Точками обозначено расположение кислородсодержащих участков

Для образования благоприятной решётки необходимо 12 атомов кислорода. В участке полипептидной петли, участвующей в её формировании, их вполне достаточно.

Исключительно важная роль Na-K-насоса в жизни клетки должна предполагать и наличие механизмов управления им. Действительно,

обнаружено много соединений эндо- и экзогенного происхождения, которые способны управлять активностью насоса. Прежде всего, активность насоса управляется концентрацией ионов Na в цитоплазме, точнее, отношением $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$ в ней. Это отношение изменяется в процессе функционирования клетки, особенно это относится к возбудимым клеткам, нейронам, электрическая активность которых сопровождается втекающими в клетку импульсами натриевого тока. Насос увеличивает эффективность своей работы с ростом этого отношения, достигая максимума своей активности при значении около 5:1, типичном для интенсивно работающего нейрона. В покоящейся клетке, в которой это отношение близко к 1:5, активность насоса падает до уровня 10% от максимальной. Увеличивать эффективность нормально работающего насоса нет необходимости, а вот ингибировать активность Na-K-ATFазы вполне возможно. Ряд молекул стероидной природы (типа известного сердечного гликозида растительного происхождения убаина и некоторых гормонов) могут связываться с белком в характерных местах, показанных на рис. 5.9 звёздочками, и блокировать работу насоса. Зачем это нужно? Дело в том, что блокировка насоса приводит к возрастанию концентрации ионов натрия в клетке из-за его пассивного транспорта в клетку снаружи, а это в свою очередь вызывает ряд последствий. Во-первых, изменяется величина электрического потенциала на клеточной мембране, а от него зависит работа ферментов, связанных с мембраной. Во-вторых, ионы натрия являются непосредственными регуляторами скорости многих внутриклеточных процессов. В-третьих, в некоторых клетках помимо Na-K-насосов существуют и другие устройства для трансмембранного переноса. Например, в клетках сердечной мышцы, кардиомиоцитах, есть устройства для переноса ионов кальция в клетку за счёт вывода ионов натрия наружу (пример антипорта, рис. 5.8). Рост концентрации Na^+ в клетке при этом сменяется увеличением концентрации Ca^{++} , известного медиатора мышечного сокращения, увеличивающего силу сердечных сокращений.

Интересно проследить энергетику отдельных стадий цикла работы насоса. Сделаем расчёт для типичной ситуации. Концентрации ионов калия, натрия и хлора, а также величины потенциалов покоя для разных клетках различаются. Принято считать, что за типичные усреднённые значения можно принимать $[\text{K}^+]_i = 150 \text{ mM}$, $[\text{Na}^+]_i = 15 \text{ mM}$, $[\text{Cl}^-]_i = 9 \text{ mM}$, $[\text{K}^+]_e = 4,5 \text{ mM}$, $[\text{Na}^+]_e = 140 \text{ mM}$, $[\text{Cl}^-]_e = 150 \text{ mM}$. Типичный потенциал покоя клетки можно принять за -70 mV . (минус внутри клетки!). Диффузионный потенциал для перепада концентрации ионов калия по Нернсту:

$$V_D = (RT/F) \ln(150/4,5) = 90 \text{ mV}$$

При переносе K^+ насос преодолевает этот потенциальный барьер. Однако перенос заряда при этом идёт *по* электрическому потенциалу и величина результирующего барьера остаётся $90 - 70 = 20 \text{ mV}$. Для ионов натрия:

$$V_D = (RT/F) \ln(140/15) = 60 \text{ mV}$$

Перенос заряда идёт *против* электрического потенциала. Барьер при этом возрастает до величины $60 + 90 = 130 \text{ mV}$.

Кстати говоря, для ионов Cl^- :

$$V_D = (RT/F) \ln(150/9) = 70 \text{ mV}$$

Полярность и величина электрического потенциала почти точно компенсирует высоту диффузионного. Таким образом, распределение ионов хлора – равновесное.

Подсчитаем теперь «полезные» энергетические затраты насоса (за один цикл работы с учётом стехиометрии переносов):

$$W = 2 \cdot 20 + 3 \cdot 130 = 430 \text{ meV}$$

Сравним их с затраченной за цикл энергией АТФ. Типичная величина энергии гидролиза АТФ, оцененная в предыдущем разделе, составляет 11-12 ккал/М или около 500 meV на одну молекулу. Коэффициент «полезного» действия при этом составляет $430/500 = 0,86$. Это очень высокое значение говорит, что насос работает в условиях близких к равновесным. Действительно, эксперименты выяснили, что если фактическое распределение переносимых ионов таково, что энергетический барьер, вычисленный выше, становится отрицательным, то происходит *обратный* поток ионов через насос, и вместо гидролиза идёт синтез АТФ, т. е. насос превращается в генератор! Это ещё раз подтверждает, что живая клетка не терпит расточительности и подбирает энергию везде, где она «плохо лежит».

5.1.2.2. Кальциевый насос

Кальциевый насос изучен менее, чем натрий-калиевый, но выполняемая им функция не менее важна. Ионы Ca^{++} – это важнейшие неорганические регуляторы клеточных процессов. Они, как правило, играют роль активаторов внутриклеточных процессов, поэтому их концентрация в покоящейся клетке должна быть минимальной. Именно благодаря активности кальциевых насосов концентрация Ca^{++} в цитозоле неактивной клетки поддерживается на уровне 10^{-8} – 10^{-7} М. при концентрации вне клетки и в некоторых клеточных органеллах – 10^{-3} – 10^{-4} М. Са-АТФ-аза насоса обеспечивает активный вынос 2 ионов кальция из цитозоля клетки на одну гидролизованную молекулу АТФ.

Как и в случае натрий-калиевого насоса Са-АТФ-аза является транс-мембранным белком, пронизывающим мембрану 10 или 11 раз в зависимости от типа насоса. Конформационное превращение белка сопрягается с изменением сродства к Ca^{++} синхронно с транслокацией участка полипептидной цепи, ответственного за удержание Ca^{++} (рис. 5.12).

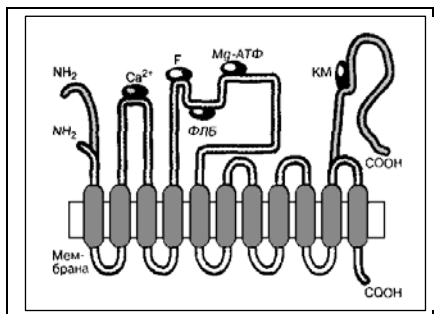


Рис. 5.12. Схема расположения Ca^{++} -АТФ-азы в мембране. У цитоплазматического фермента С-конец полипептидной цепи экспонирован в цитоплазму клетки, у саркоплазматического фермента С-конец погружен в объем ретикулула

Схема циклического процесса переноса ионов кальция ферментным комплексом показана на рис 5.13.

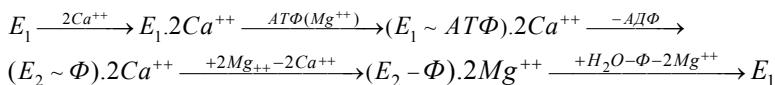


Рис. 5.13

Если фермент находится в конформации E_1 , в которой участок с высоким сродством к ионам кальция экспонирован в цитоплазму, 2 Ca^{++} соединяются с ним и облегчают присоединение к ферменту молекулы АТФ.

В присутствии двухвалентных ионов магния (или марганца) реализуются ферментативные (АТФ) свойства комплекса, а именно: АТФ расщепляется, белок фосфорилируется, а АДФ освобождается в цитозоль. Это промежуточное состояние комплекса оказывается конформационно напряжённым, и возникает переход в состояние E_2 , у которого ионы кальция экспонированы наружу.

Новое состояние фермента E_2 за счёт частичной реализации энергии фосфатного макроэрга продолжает изменять свою структуру в результате чего сильно падает сродство белка к ионам кальция и они становятся доступными к обмену с окружающей средой по другую сторону мембраны. В итоге ионы магния вытесняют их из комплекса.

Присутствие Mg^{++} в ферментном комплексе провоцирует гидролиз его фосфатной группы, в результате которого ионы Mg^{++} диссоциируют, а конформация белка, освободившегося от фосфатной группы, вновь становится неравновесной. Это побуждает его в поисках минимума энергии вернуться в исходное состояние, при котором места связывания ионов Ca^{++} снова экспонированы внутрь клетки. Цикл замыкается.

Как видно, свободная энергия гидролиза одной молекулы АТФ пошла на изменение константы связывания Ca^{++} полипептидной петлей при изменении её геометрии и на её транслокацию. Константа связывания изменяется от $2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ до значения менее $2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. Молекулярный механизм изменения сродства в кальциевой АТФ изучен пока меньше, чем для натрий-калиевой.

Перепад концентраций, против которого работает насос, соответствует диффузионному потенциалу $2kT \ln[Ca^{++}]_o/[Ca^{++}]_i \approx 500 \text{ meV}$, т. е. почти равен энергии гидролиза АТФ в физиологических условиях. Это значит, что кальциевый насос, так же, как и натрий-калиевый, способен работать обратимо. Действительно, эксперимент показывает, что, когда концентрация Ca^{++} значительно превышает равновесную, Ca^{++} -АТФ-аза превращается в АТФ-синтазу, т. е. начинает синтезировать АТФ!

Следует заметить, что кальциевый насос, перенося 2 Ca^{++} , переносит через мембрану сразу 4 элементарных заряда, т. е. его работа должна создавать электрический потенциал или преодолевать существующий потенциал на мембране. На внутриклеточной мембране эндоплазматического ретикулума электрический потенциал близок к нулю, он снижается за счёт её высокой проницаемости к другим внутриклеточным ионам. А на наружной клеточной мембране потенциал покоя достаточно велик, и его полярность препятствует выкачиванию Ca^{++} наружу, что должно приводить к дополнительным затратам энергии цитоплазматического кальциевого насоса. Этот вопрос пока недостаточно изучен.

Кальциевый насос имеет несколько механизмов управления и внешнего воздействия. Так, показанный на рис. 4.10 С-конец цитоплазматической кальциевой АТФ-азы, выступающий длинным хвостом в цитоплазму, содержит центр связывания белка *кальмодулина*

(КМ). Этот хвост, нависая над телом фермента и закрывая центры связывания ионов кальция, тем самым блокирует работу насоса. Кальмодулин нейтрализует эту автоблокировку, и реактивирует насосную функцию АТФ. У эндоплазматического насоса также имеется модулятор активности, это белок *фосфоламбана*. Его посадочное место, обозначенное на рисунке 4.10 как ФЛБ, находится на петле, недалеко от центров связывания фосфатной группы (Ф) и Mg-АТФ. Связываясь с белком, фосфоламбана уменьшает константу связывания Ca^{++} со своим центром связывания и блокирует работу насоса. Внутриклеточные киназы могут при необходимости фосфорилировать фосфоламбан и лишить его ингибиторных свойств.

Наряду с чувствительностью кальциевого насоса к подобным физиологическим регуляторам насос является также мишенью действия посторонних факторов, как правило, неблагоприятных. Снижение эффективности работы насоса под действием многих ксенобиотиков или увеличение проницаемости клеточной мембраны для ионов кальция из-за перекисного окисления липидов мембраны приводит к росту его внутриклеточной концентрации. Активирующая роль ионов кальция может привести к неблагоприятным сдвигам скоростей биохимических реакций и к развитию соответствующих патологий. Если это происходит, например, в клетках сосудистых стенок, то увеличение их мышечного тонуса при увеличении внутриклеточной концентрации Ca^{++} может привести к гипертонии.

5.1.3. Осмотические явления.

5.1.3.1. Осмотическое давление.

Осмотические явления играют важную роль во внутри- и в межклеточных процессах переноса вещества. В основе этих явлений лежит понятие осмотического давления $\pi = RTC = kTn$. Кажущаяся простота этого понятия часто приводит к недоразумениям. Например, иногда считают, что появление в растворителе некоторого растворённого вещества с молярной концентрацией C приводит к появлению в растворе дополнительного давления RTC . Вообще говоря, это не так. Величина RTC действительно имеет размерность давления, но к реальному давлению в растворе она не имеет прямого отношения, как было бы при появлении примеси в идеальном газе при постоянном объёме, где новые молекулы занимают *пустое* место и, увеличивая число частиц в единице объёма, *увеличивают* давление (вспомним, что в газе $P = kTn$). В жидкости растворённое вещество *вытесняет*

молекулы растворителя и изменение давления не столь очевидно. Откуда же появилось это странное «давление» π ?

Вспомним выражение для химического (или электрохимического) потенциала вещества в растворе:

$$\mu = \mu_0 + RT \ln a + PV_0 + zF\varphi \quad (5.48)$$

Здесь μ_0 – химический потенциал в стандартных условиях, a – активность вещества, P – *избыток* гидростатического давления над стандартным (атмосферным), V_0 – мольный объём вещества, zF – мольный заряд вещества, φ – электрический потенциал. Выпишем отдельно хим. потенциалы для растворённого вещества (индекс s) и растворителя (индекс w), предполагая для простоты, что это – водный раствор и помня, что молекулы воды не заряжены.

$$\mu_s = \mu_{0s} + RT \ln a_s + PV_s + z_s F \varphi \quad (5.49.)$$

$$(5.50.)$$

Вспомним, что *по определению* активности вещества это:

$$a = \gamma C,$$

γ – коэффициент активности. Однако для воды как важнейшего растворителя сделано важное исключение: по определению *активность воды* это её *мольная доля* в растворе:

$$a_w = \frac{n_w}{n_w + \sum n_s} = \frac{1}{1 + \frac{V_w \sum n_s}{V_w \cdot n_w}} \approx 1 - V_w \sum C_s \quad (5.51.)$$

Суммирование проводится по всем растворённым веществам.

В простом преобразовании, которое сделано в (5.51), мы допустили, что мольная доля всех растворённых веществ значительно меньше мольной доли воды. Это достаточно хорошее приближение, т. к. речь идёт о числе молей в объёме, а вода – самое низкомолекулярное соединение. Упростим теперь выражение для $\ln a_w$ в тех же предположениях:

$$\ln a_w = \ln(1 - V_w \sum C_s) \approx -V_w \sum_s C_s \quad (5.52.)$$

и подставим его в (5.50.):

$$\mu_w = \mu_{0w} + PV_w - V_w RT \sum_s C_s = \mu_{0w} + V_w (P - \pi) \quad (5.53.)$$

где

$$\pi = \sum \pi_s \quad \pi_s = RT C_s \quad (5.54.)$$

Из полученных выражений хорошо видно, что растворение вещества, очевидно, *увеличивает* его активность в растворе (см. формулу 5.49.), но при этом *уменьшает* активность воды! (формула 5.51). Представим теперь, что два водных раствора разного состава приведены в контакт через водонепроницаемую мембрану (рис.5.14).

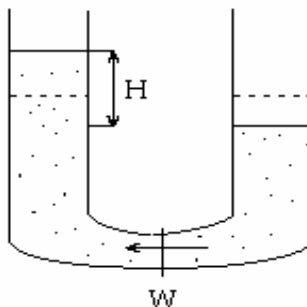


Рис. 5. 14.

Пусть для простоты первоначальные давления в месте контакта (т. е. уровни растворов в сосудах были одинаковы), и пусть молекулы растворённых веществ не заряжены. Если мембрана пропускает только воду, то растворённые вещества в равновесие между сосудами придти не смогут, а вода сможет. Условия равновесия водной фазы (равенство хим. потенциалов воды) запишется так:

$$\Delta\mu = V_w [(P_1 - \pi_1) - (P_2 - \pi_2)] = V_w [(P_1 - P_2) - (\pi_1 - \pi_2)] = 0 \quad (5.55.)$$

Или

$$P_1 - P_2 = \pi_1 - \pi_2. \quad (5.56.)$$

Здесь, наконец, разность *осмотических* давлений между двумя сосудах в условиях установившегося *равновесия* водных фаз проявилась в разности *гидростатических* давлений между ними. Эту разницу реальных давлений можно измерить, как установившуюся разность высот уровней жидкости H.

Полезно напомнить, что активность вещества в отличие от его концентрации, является мерой подвижности и реакционной способности вещества в данном месте. Активность вещества и, в частности, воды может измениться при неизменной его концентрации, если вещество (вода) захвачено в «клетку», связано другим веществом, адсорбировано на поверхности какой-либо геометрии. Для учёта такого вида потери активности воды иногда к осмотическому давлению добавляют величину, именуемую «матричным потенциалом» τ . Матричный по-

тенциал фигурирует при этом в уравнении осмотического равновесия наряду с осмотическим потенциалом:

$$P_1 - P_2 = \pi_1 + \tau_1 - \pi_2 - \tau_2 \quad (5.57.)$$

Именно матричный потенциал смачиваемых (т. е. захватывающих воду) стенок сосудов отвечает за подъём жидкости в капилляре.

Осмотические явления лежат в основе процессов, обеспечивающих «тургор», т. е. вздутие клеточных органелл (типа вакуолей), объёмов клеток, бактерий или обратный эффект «сморщивания» формы в зависимости от направления осмотического перемещения воды. Если раствор в объёме с водопроницаемой оболочкой помещён в раствор с большей концентрацией осмотически активных веществ («гипертонический раствор»), то объём будет обезвоживаться, если он контактирует с дистиллятом («гипотонический раствор»), то наоборот, будет набухать. Пример изменения формы вакуоли в растительной клетке при изменении осмотического потенциала внешней среды приведен на рис. 5. 14

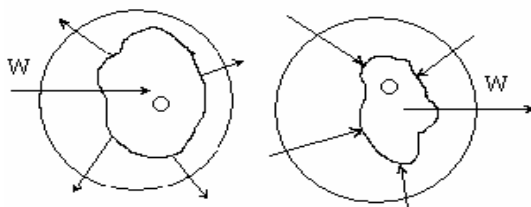


Рис.5.14.

Возникающая «сосущая» сила может достигать весьма значительных величин. Так, при разности активностей растворенных веществ 0,1 М. сосущая сила при комнатной температуре составляет около 2,5 атм., т. е. может преодолевать высоту подъёма раствора 25 м.! Следует подчеркнуть, что осмотические процессы контролируются только величинами осмотического и матричного потенциалов и в явном виде не зависят от химической природы растворённых веществ. Эти потенциалы определяются *молярными* концентрациями, поэтому наибольшая осмотическая активность принадлежит *низкомолекулярным* компонентам.

5.1.3.2.Трансмембранные осмотические потоки.

Сосущая сила наряду с разностью гидростатических давлений вызывает потоки растворителя и растворённого вещества через границу раздела жидких сред. Для рассмотрения задач клеточного уров-

ны нас интересуют потоки через границы типа мембран. Рассчитать их в общем случае весьма сложно, но если ограничиться случаем малых потенциалов, то можно использовать аппарат линейной термодинамики необратимых процессов и получить полезные результаты в достаточно общем виде. Обращаясь к хим. потенциалам растворённого вещества и растворителя, заметим, что величины трансмембранных потоков зависят не от самих величин μ_s и μ_w , а от их трансмембранной разности. В предположении малости потенциалов и их изменений из (5. 49.) и (5. 53.) можно получить:

$$\Delta\mu_s = V_s \Delta P + \frac{\Delta\pi_s}{\bar{C}_s} + (z_s F \Delta\varphi) \quad (5. 58)$$

Здесь учтено, что $\Delta \ln a_s = \Delta a_s / \hat{a}_s = \Delta C_s / \hat{C}_s$, где \hat{a}_s и \hat{C}_s средние значения активности и концентрации растворённого вещества в мембране, соответственно.

$$\Delta\mu_w = V_w \Delta P - V_w \Delta\pi_s \quad (5. 59)$$

Воспользуемся линейной связью обобщённых потоков и потенциалов (2. 71), тогда, опуская пока последний член в (5. 58), получим:

$$\begin{aligned} J_w &= L_{ww} \Delta\mu_w + L_{ws} \Delta\mu_s \\ J_s &= L_{sw} \Delta\mu_w + L_{ss} \Delta\mu_s \\ L_{sw} &= L_{ws} \end{aligned} \quad (5.60)$$

и выразим диссипативную функцию по (2. 72):

$$\begin{aligned} \sigma &= \sum J_i X_i = J_w (V_w \Delta p - V_w \Delta\pi_s) + J_s (V_s \Delta p + \frac{\Delta\pi_s}{\bar{C}_s}) = \\ &= (J_w V_w + J_s V_s) \Delta p + (\frac{J_s}{\bar{C}_s} - J_w V_w) \Delta\pi_s = J_v \Delta p + J_d \Delta\pi_s \geq 0 \end{aligned} \quad (5. 61)$$

Это выражение нам удалось записать так, что в роли обобщённых сил вместо $\Delta\mu_w$ и $\Delta\mu_s$ стали выступать ΔP и $\Delta\pi_s$, величины физически более осязаемые, чем $\Delta\mu_w$ и $\Delta\mu_s$, а в качестве потоков - объёмный поток раствора под действием перепада гидростатического давления:

$$J_v = J_w V_w + J_s V_s \quad (5.62)$$

и диффузионный поток растворённого вещества, вызываемый градиентом его концентрации, относительно текущего растворителя:

$$J_d = J_s / \bar{C}_s - J_w V_w \quad (5.63)$$

Если размерность J_w и J_s это моли/площадь·время, то размерность J_v и J_d это объём/площадь·время. Теперь можно записать, что:

$$\left. \begin{aligned} J_v &= L_{pp}\Delta p + L_{p\pi}\Delta\pi_s \\ J_d &= L_{\pi p}\Delta p + L_{\pi\pi}\Delta\pi_s \end{aligned} \right\} \quad (5.64),$$

где L_{ik} – новые онзагеровские коэффициенты. Их физический смысл очевиден:

$$L_{pp} = \frac{J_v}{\Delta p} \Big|_{\Delta\pi_s=0} \quad (5.65)$$

Это – коэффициент *гидравлической проводимости*.

$$L_{\pi\pi} = \frac{J_d}{\Delta\pi_s} \Big|_{\Delta p=0} \quad (5.66)$$

Это – коэффициент *диффузионной проводимости* или иначе – *проницаемость* мембраны для растворённого вещества.

$$L_{\pi p} = \frac{J_d}{\Delta p} \Big|_{\Delta\pi_s=0} = L_{p\pi} = \frac{J_v}{\Delta\pi_s} \Big|_{\Delta p=0} \quad (5.67)$$

Это – коэффициенты *ультрафильтрации* и *осмотического потока*, соответственно. Отношение двух коэффициентов:

$$- \frac{L_{p\pi}}{L_{pp}} = \lambda \quad (5.68)$$

получило название *коэффициента отражения*. Его величин лежит в пределах от 0 до 1 и характеризует *непроницаемость* растворённого вещества через мембрану. Так, например, для мочевины через мембрану эритроцита $\lambda=0,65$, для сахарозы через мембрану растительной клетки $\lambda=1,0$, для этанола через стенку гигантской одноклеточной водоросли $\lambda=0,44$. При $\lambda \neq 0$ можно получить более общее выражение для Δp при установлении стационарного состояния. В частности из (5.64) и (5.68) получим:

$$L_{\pi\pi} = \frac{J_d}{\Delta\pi_s} \Big|_{\Delta p=0} \quad (5.69)$$

Если установилось стационарное состояние, при котором объёмный поток отсутствует, т. е. $J_v=0$, то из (5.69) следует:

$$\Delta p = \lambda \Delta\pi_s \quad (5.70)$$

Если растворённое вещество не проникает через мембрану, т. е. $\lambda=1$, то мы получаем уже известный результат для равновесного состояния растворителя: $\Delta p = \Delta\pi_s$. Если $\lambda=0$, то результат также очевиден: $\Delta p = 0$. В этом случае мембрана не селективна, пропускает и воду,

и растворённое вещество, и стационарное состояние превращается в тривиальное полное термодинамическое равновесие. При промежуточном значении λ результат (5.70) оказывается новым. В этом случае и перенос растворителя, и поток растворённого вещества не равны нулю, но компенсируют друг друга, давая нулевую величину объёмного потока раствора. При этом условии получим для диссипативной функции:

$$\sigma = J_d \Delta\pi_s = \Delta\pi_s (-\lambda L_{pp} \Delta p + L_{\pi\pi} \Delta\pi_s) = \Delta\pi_s^2 (L_{\pi\pi} - \lambda^2 L_{pp}) \quad (5.71)$$

Отсюда видно, что скорость диссипации энергии в этом стационарном состоянии убывает с ростом λ , т. е. чем больше селективность мембраны, тем меньше потери свободной энергии, расходуемой на поддержание стационарного состояния.

До сих пор мы считали, что молекулы растворённого вещества не имеют заряда. Если это не так, то в (5.58) нужно учесть последний член. Для простоты пренебрежём в этом случае перепадом концентрации растворённого вещества. Тогда для потоков вещества и зарядов в линейном приближении будут справедливы соотношения, соответственно,:

$$J_m = L_{pp} \Delta p + L_{p\varphi} \Delta \varphi \quad (5.72)$$

$$J_q = L_{\varphi p} \Delta p + L_{\varphi\varphi} \Delta \varphi \quad (5.73)$$

$$L_{p\varphi} = L_{\varphi p}$$

Из этих уравнений легко получаются известные частные случаи. Случай *электроосмоса*:

$$(J_m/J_q)_{\Delta p=0} = L_{p\varphi}/L_{\varphi\varphi} \quad (5.74)$$

Случай *тока переноса*:

$$(J_q/J_m)_{\Delta\varphi=0} = L_{\varphi p}/L_{pp} \quad (5.75)$$

Электроосмотическое давление определяется как

$$(\Delta p/\Delta\varphi)_{J_m=0} = -L_{p\varphi}/L_{pp} \quad (5.76)$$

Наконец, *потенциал течения* находится как:

$$(\Delta\varphi/\Delta p)_{J_q=0} = -L_{\varphi p}/L_{\varphi\varphi} \quad (5.77)$$

Эти понятия часто встречаются в исследованиях особенно-стей переноса веществ в конкретных биологических ситуациях, а также в биотехнологии при конструировании или использовании устройств для разделения и очистки веществ.

5.2. Биологическая подвижность. Механохимия.

Одним из следствий термодинамической неравновесности живой системы является её способность к активным формам движения. Практически все окружающие нас тела обладают в той или иной степени подвижностью типа перемещения или деформации под дей-

ствием внешних сил. Хорошо известны и специальные технические устройства, способные преобразовывать подводимую энергию в кинетическую энергию целесообразных форм движения (тепловые машины, в том числе взрывные устройства, электрические, гравитационные, пружинные двигатели т. п.). И в этом смысле активное движение живых организмов не является чем-то уникальным. Отличительной чертой живой материи является, пожалуй, лишь миниатюрность живых движителей и огромное разнообразие форм движений в любой живой системе, независимо от её биологической специализации, а также, разумеется, способность к самосборке всей живой системы. Целесообразные формы активной подвижности ансамблей клеток, образующих целый организм или его органы, всегда сопровождаются столь же целесообразными активными движениями внутриклеточных компонент, что в совокупности обеспечивает высокую эффективность преобразования химической или электрохимической биологической энергии в механическую работу.

Механохимические процессы в живых системах обычно разделяют на два класса: мышечная работа (в первую очередь – поперечно полосатые мышцы) и явления внутриклеточной подвижности. Исторически раньше началось изучение мышечной системы, и она на сегодняшний день изучена достаточно глубоко. Однако за последние годы развитие экспериментальных методов биофизики клетки обеспечило значительный прогресс в исследовании внутриклеточной биомеханики. Изучение чрезвычайно разнообразных видов внутриклеточных биомеханических процессов привело к выводу, что именно эти эволюционно более древние формы биологического движения следует рассматривать как фундаментальные элементы более высоко организованных форм биологической подвижности. Поэтому, восстанавливая историческую справедливость, мы начнём знакомство с биомеханикой с внутриклеточных типов активного движения. Рассматриваемые процессы отнесены к классу *механохимических*, т. к. источником механической энергии в данном случае служит химическая энергия макроэргических связей, извлекаемая при гидролизе АТФ.

5.2.1. Внутриклеточная механохимия.

Сразу же следует отметить два важных обстоятельства. Во-первых, представление о том, что малые молекулы, их ионы, метаболиты и клеточные органеллы перемещаются внутри клетки посредством свободной диффузии, является сильным упрощением. Более того, нельзя быть уверенным в справедливости общепринятого представле-

ния о том, что основой цитоплазмы является жидкая водная среда. Имеются веские основания предполагать, что внутриклеточная среда в процессе функционирования клетки переходит из состояния золь в гель и наоборот. Высказывается и крайняя точка зрения, реанимирующая давнее представление о том, что клеточная мембрана в сущности - виртуальное образование, а приписываемые ей свойства являются проявлением именно особых состояний цитоплазмы типа золь/гель. Не обсуждая эти пока недоказанные утверждения, следует признать, тем не менее, наличие внутри клетки специализированных структур, по которым преимущественно перемещаются метаболиты и внутриклеточные органеллы. Во - вторых, относительная неизменность формы клетки при интенсивном внутриклеточном движении её компонентов обеспечивается наличием внутриклеточного механического каркаса - «цитоскелета», поддерживающего форму клетки и одновременно создающего внутреннюю архитектуру транспортных путей, по которым осуществляется движение метаболитов и органелл. Эта структуризация внутренней среды заменяет хаотичное трёхмерное блуждание движущихся частиц их целенаправленным двух- или одномерным перемещением. Это не исключает, однако, использования в качестве движущей силы градиента активности подвижных частиц. Наряду с этим наличие направляющих транспортных структур химически определённого типа позволяет в принципе использовать молекулярные переносчики, комплементарно взаимодействующие с компонентами транспортного пути, и при наличии источника энергии осуществлять направленный *активный* перенос биологически важных частиц. Полезно отметить и ещё одно любопытное обстоятельство. Клетка, включаясь в ткань, обычно теряет свою индивидуальность, становясь элементом ансамбля, выполняющего некую физиологически важную функцию. Между тем, оказавшись отделённой от ансамбля, она вновь становится самодостаточной, проявляя скрытые в ней способности адгезии к подложке, движения по ней, изменения своей формы. Эти внешние проявления механической активности клетки обеспечиваются компонентами внутриклеточного цитоплазматического скелета. Это означает, что механохимические потенциалы живых клеток исходно присущи клеткам и лишь их востребованность условиями существования клетки выявляет те или иные их формы.

Цитоскелет формируется тремя основными типами элементов: микрофиламентов, микротрубочек и промежуточных филаментов. Основу химической структуры этих элементов составляют белки: *актины* в микрофиламентах, *тубулины* в микротрубочках и некоторые специальные белки в промежуточных элементах.

Микрофиламенты. Актин, являясь мономером в полимерной структуре микрофиламента, имеющего вид нитей диаметром 6-7 нм, «поляризован», в том смысле, что его способность вступать в реакцию полимеризации больше на одном его конце («плюс» конец), чем на другом («минус» конец). Поэтому полимеризующаяся цепь микрофиламента обычно растёт с «плюс» конца и укорачивается с «минус» конца. Скорость процессов полимеризации и деполимеризации регулируется специальными белками, и в зависимости от их активности длина полимера изменяется. Другая группа белков способна инициировать полимеризацию нескольких микрофиламентов из одного узла или начинать синтез боковой ветви микрофиламента. При этом образуются пучки нитей или, соответственно, их сети. В нормальных условиях идёт непрерывный синтез и распад нитей, так что в цитоплазме количества свободных и связанных молекул актина примерно одинаковы. Актин – один из самых распространённых белков эукариотных клеток. Другим важным для биомеханики белком является *миозин*. Известно около 80 типов внемышечных миозинов. Они интересны тем, что способны своей «головкой» присоединяться сбоку к отдельным мономерам в цепи микрофиламента, а другой своей частью («хвостом») соединятся с мембраной органеллы. Головка обладает АТФ – азной активностью, а энергия гидролиза АТФ вызывает изменение структуры миозина с переключением связи головки с одного мономера актина в микрофиламенте на другой, порождая движение комплекса миозин-органелла вдоль оси микрофиламента (от плюс конца к минус концу (рис.5.15)).

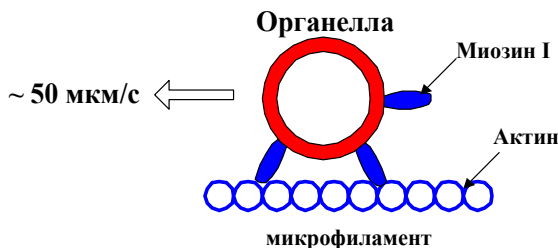


Рис. 5. 15. Схематическое изображение перемещения клеточной органеллы по микрофиламенту.

Другой тип механической активности реализуется комплексом актин+миозин в сетчатой системе микрофиламента. Такие сети, локализуясь под клеточной мембраной, образуют каркас типа корсета («кортекс»), деформация которого вызывает локальное изменение

формы мембраны, создавая клеточные выросты («псевдоподии»), с помощью которых клетки могут перемещаться, или управляя формой уже имеющихся специальных выростов типа волосков, антенн, стереоцилий. Разновидность миозина с более длинным хвостом соединяет между собой отдельные нити микрофиламентов, а АТФ-азная активность головки миозина, вызывая, как и в предыдущем случае, конформационный переход в молекуле миозина, деформирует микрофиламентную сеть и управляет формой прилегающей мембраны. На рис. 5.16. в качестве примера показана схема подвижности микроворсинок в кишечном эпителии.

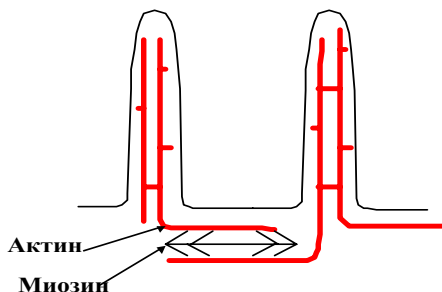


Рис. 5. 16. Схема изгиба микроворсинок при взаимном скольжении микрофиламентов, вызываемом изменением ориентации миозиновых мостиков.

Микротрубочки являются элементами другой механохимической системы. Основу их состава представляет белок тубулин, гетеродимер, состоящий из двух субъединиц α и β , с молекулярным весом 53 и 55 кДа, соответственно. Гетеродимеры также «поляризованы» и в процессе однонаправленной полимеризации образуют полые трубки диаметром 25 нм. В отличие от микрофиламентов, имеющих в каждой клетке

множество центров полимеризации, более крупные образования микротрубки имеют очень ограниченное число центров роста, иногда 1-2 на всю клетку. Такие центры видны в обычный оптический микроскоп в виде centrosомы, из которой растёт митотическое веретено, или базального тельца, из которого растут микротрубочки жгутиков и ресничек. В первом случае своими растущими «плюс» концами трубочки присоединяются к кинетохорам хромосом и участвуют в митотических движениях хромосом. Некоторые химические соединения клетки, а также сторонние вещества (такие как соединения растительного происхождения колхицин и таксол) способны ингибировать ак-

тивность «плюс» или «минус» концов микротрубочек и регулировать, соответственно длину трубочек вплоть до их полного исчезновения. Поэтому их количество и размеры в живой клетке постоянно меняются в соответствии с её физиологическими потребностями.

Микротрубочки также служат транспортными путями, но являются «магистральными» дорогами в отличие от микрофиламентов, исполняющих роль местных путей. В качестве движителей, переносящих органеллы по трубочкам, служат специальные белки: *кинезины* (перемещающие органеллы к «плюс» концу трубочки) и *динеины* (переносящие груз к «минус» концу). Одним пассивным концом белок связывается с органеллой, а другим раздвоенным концом с двумя АТФ-азно активными головками - с поверхностью трубок. При гидролизе АТФ головки совершают шагающие движения, подобные вращениям измерительной рогатки землемера, и перемещают груз вдоль поверхности трубок (рис.5.17). Направление движения может оперативно изменяться. Предполагается, что на поверхности органелл всегда находятся и кинезины и динеины, но клетка активирует их связь с микротрубочкой (вероятно посредством фосфорилирования головок одного или другого белка) в зависимости от требуемого направления перемещения.

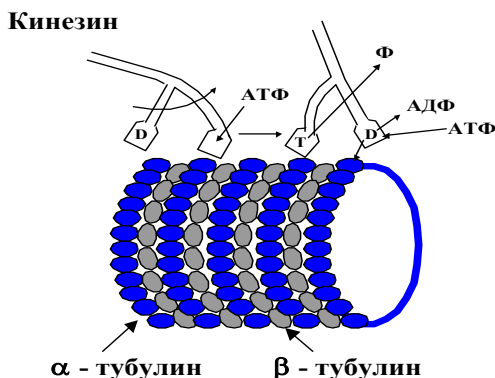


Рис.5.17. Схема движения динеина по микротрубочке.

Имеющиеся сведения о кинематике подобного движения и о стехиометрии процесса позволяет оценить к.п.д. этого нанодвижителя. Один шаг перемещения составляет 8 нм, а частота шагания около 100 в секунду, это даёт для линейной скорости движения 800 нм в сек. Сила трения, оцененная из размеров и вязкости, составляет при этом величину около 5 пН. Это даёт для механической «полезной» мощно-

сти движителя $W=Fv=4 \cdot 10^{-18}$ Вт, а затраченная мощность гидролиза ($\Delta G_{\text{АТФ}}/\Delta\Phi \approx 0,4$ эВ х на 100 молекул за секунду) равна $8 \cdot 10^{-18}$ Вт. Отсюда к.п.д. - около 50%.

Микротрубочки могут образовывать более сложные системы, выполняющие, соответственно, более сложные функции. На рис. 5. 17. показана структура из 2 х 9+2 трубочек, типовая структура, лежащая в основе строения ресничек и жгутиков.

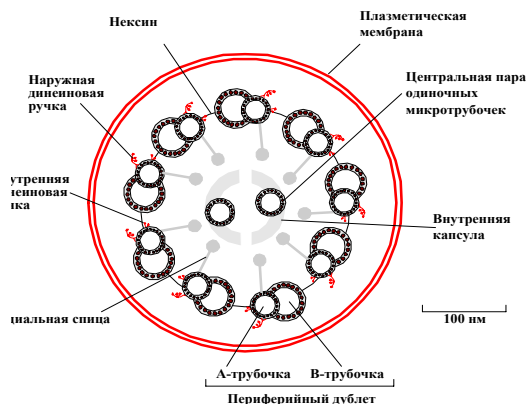


Рис.5. 17. Схема строения жгутика сперматозоида.

Микротрубочки типа А и В в парах могут скользить друг по другу при конформационных переходах в динеинах, играющих роль внутренних и наружных «ручек», но радиальные спицы, связанные с внутренней капсулой, препятствуют свободному вращению и вызывают закручивание периферических трубочек относительно центральной пары. Тесный контакт этой составной конструкции с митохондриальной хондриосомой обеспечивает систему АТФ – субстратом АТФ-азно активных молекул динеина.

Промежуточные филаменты получили своё название из-за своего диаметра 8-10 нм – промежуточного между диаметрами микрофиламентов и микротрубочек. Их отличительная черта - большое количество в клетках и относительно высокая устойчивость по отношению к внешним воздействиям. При этом они легко перестраиваются под действиям внутриклеточных сигналов. Клеточная функция этих образований пока не ясна, но предполагается, что в основном

они обеспечивают механическую прочность клеток. В состав промежуточных филаментов входят разные белки в клетках разных тканей, но и внутри одной ткани они отличаются большим разнообразием. Так, в состав филаментов клеток эпителия входят более 30 типов белка кератина. Значение этого обстоятельства остаётся непонятным.

Заклячая рассмотрение внутриклеточных форм активной подвижности, следует ещё раз отметить широкую распространённость этого явления и значительную универсальность его элементарных механизмов и химических соединений, используемых для их реализации. Об этом свидетельствуют, например, такие наблюдения. Нарушение синтеза одного специального типа миозина (миозина VIIA) приводит к потере специфической подвижности стереоцилий слуховых клеток и одновременно нарушает какие-то процессы в фоторецепторных клетках сетчатки глаза. Возникающее при этом наследственное заболевание (болезнь Ашера) проявляется одновременно в потере и слуха, и зрения. Известное заболевание лёгких, бронхит, выражающееся в потере механической активности волосков клеток в эпителии бронхов, сопровождается одновременно развитием мужского бесплодия, из-за потери подвижности сперматозоидов. Упомянутое выше ингибирующее действие колхицина и таксола на полимеризацию и деполимеризацию микрофиламентов одинаково проявляется на различных типах клеток, что говорит о высокой степени универсальности химических средств управления механикой внутриклеточных процессов. Фундаментальность этих процессов ещё не полностью осознана биофизиками.

5.2.2. Мышечное сокращение.

5.2.2.1. Строение поперечно полосатых мышц.

Механохимический аппарат, предназначенный для совершения внешней (по отношению к клетке) механической работы развился в ассоциированную систему актомиозиновых комплексов, которые суммируют свои механические усилия в макроскопическую равнодействующую. Клетки образуют волокна, которые группируются в мышцы. Менее пространственно упорядоченные волокна образуют гладкую мускулатуру сердца, кишечника, желудка, расположенные более регулярно с выраженной периодичностью - образуют мышцы, получившие название поперечно полосатых, связанные со скелетом. Этот тип мускулатуры более непосредственно связан с совершением внешней (по отношению к организму) работы и отчасти по этой при-

чине изучен значительно полнее, чем другие механохимические системы. Мы остановимся более подробно на строении и функционировании именно этих мышц.

Современные представления о физиологии поперечно полосатых мышц опираются на фундаментальные исследования А. Хаксли середины прошлого века. Согласно этим представлениям отдельное мышечное волокно представляет собой гигантскую многоядерную клетку, заполненную параллельно расположенными тонкими нитями *актина* и толстыми нитями *миозина*. В поперечном сечении волокно выглядит как регулярное расположение тонких и толстых нитей, при котором толстые нити образуют гексагональную решётку, и каждая толстая нить равномерно окружена шестью тонкими нитями, расположенными посередине между двумя ближайшими тонкими нитями. На 1 см^2 поперечного сечения мышцы приходится до $6 \cdot 10^{10}$ толстых нитей. Между тонкими и толстыми нитями можно заметить попарные соединения. Не все они лежат в одной плоскости поперечного сечения волокна, но в проекции на такую плоскость образуют шестилучевой «цветок». Толстые нити представляют собой жгуты из отдельных нитей миозина диаметром около 15 нм и длиной порядка 1,5 мкм. Отдельные нити миозина имеют длину около 170 нм и молекулярную массу около 460 кДа. Молекулы миозина данного типа представляют собой парные образования из двух продольно скрученных друг вокруг друга субъединиц. Эти образования в основном вытянуты вдоль оси жгута. Однако более точные наблюдения показывают, что точно вдоль оси жгута ориентирована лишь часть нити длиной 100 нм («лёгкий меромиозин»), в сторону от которого отходит пара «головок» с габаритом примерно 10 нм, а между ними имеется промежуточный субфрагмент длиной около 50 нм, играющий роль «шейки», и ориентированный под некоторым углом к оси жгута. Отдельные молекулы миозина смещены друг относительно друга вдоль оси жгута на определённые расстояния, так что их головки, выступающие в стороны, последовательно развёрнуты по оси жгута на 60° . Поэтому в проекции на поперечную плоскость система головок выглядит как симметричный цветок. Тонкие нити состоят из двухтяжевых цепей полимеров актина, напоминающих ожерелье из бусинок мономеров, с расположенными на них регуляторными белками. Габариты мономерных глобул актина 4-5 нм, диаметр сплетения полимерных миофибрилл 8-10 нм, их полная длина около 1 мкм.

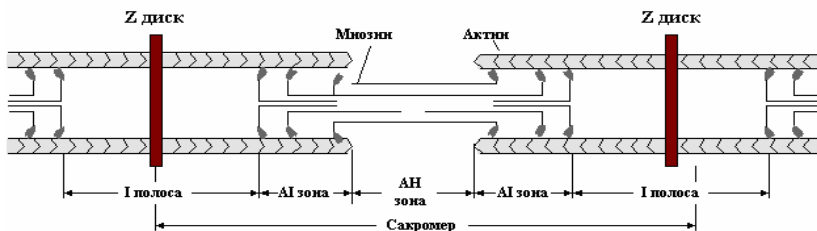


Рис. 5. 18. Схема расположения толстых (миозиновых) и тонких (актиновых) нитей в волокне.

Схема продольного расположения нитей в мышце представлена на рис. 4. 17. Группы таких параллельных нитей образуют волокна диаметром до 100 мкм, обёрнутые своей оболочкой. В одной мышечной клетке находится множество таких параллельно уложенных волокон. По своей длине волокна разделены на отдельные участки – *саркомеры*, длиной от одного до нескольких микрон. Границы между саркомерами представляют собой пластинки, называемые Z-дисками, к которым крепятся концы тонких нитей. Полная длина мышечной клетки может достигать нескольких сантиметров.

Название «поперечно-полосатые» связано с характерными особенностями изменения оптической плотности волокон вдоль их длины (рис. 5. 19), хорошо видными в оптический микроскоп.

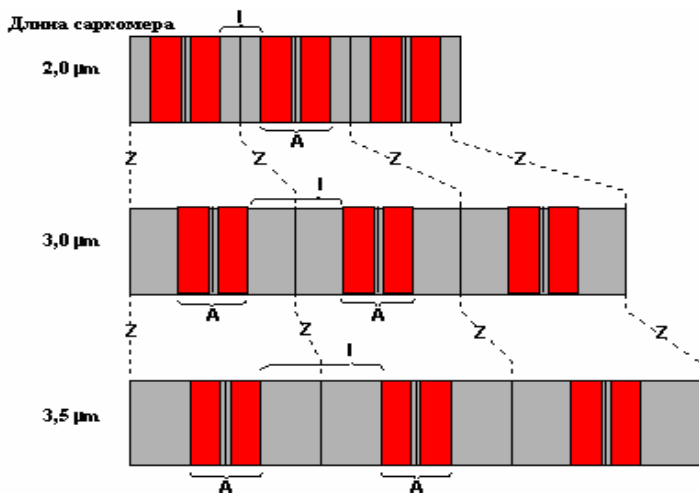


Рис. 5.19. Продольное распределение оптической плотности в мышечном волокне.

Внутри каждого саркомера можно выделить несколько зон, отличающихся оптической плотностью. Середину каждого саркомера занимают несколько тысяч «толстых» нитей миозина, которые в световом микроскопе выглядят тёмной полосой из-за проявления анизотропии (двойного лучепреломления), эта зона называется А-диск. На обоих концах саркомера находятся около тысячи «тонких» нитей актина, прикрепленных к Z-пластинкам. Это изотропные участки, выглядящие светлыми. Они называются I-дисками. Именно из-за такого периодического чередования светлых и темных полос в бесчисленных саркомерах миофибриллы сердечной и скелетной мускулатуры выглядят поперечно-полосатыми.

5.2.2.2. Элементарный акт сокращения.

В покоящейся мышце концы толстых нитей обычно лишь слабо перекрываются на границе между А- и I-дисками. Сокращение мышцы происходит из-за взаимного скольжения тонких и толстых нитей в сторону увеличения их взаимного проникновения. На рис. 5. 19 показано, что в процессе сокращения (на рисунке – стадии снизу вверх) зона А (толстые нити) практически не изменяет своего размера, в то время как размер свободного участка тонких нитей (зона I), а с ним и длина всего саркомера сокращается. Сила тяги, возникающая в местах контактов толстых и тонких нитей, передаётся на Z-диски, и через всю цепочку саркомеров прикладывается к внешней нагрузке. Разумеется, силы, развиваемые отдельными парами параллельно включённых нитей суммируются в общем усилии саркомера, а *сила* мышцы в целом складывается из всех работающих волокон, т. е. пропорциональна *сечению* мышцы. При этом линейная *скорость* сближения концов мышцы пропорциональна числу саркомеров в цепи, т. е. пропорциональна *длине* мышцы. Поэтому сильные мышцы - толстые, «быстрые» мышцы – длинные. Типичные значения скорости сокращения – $\Delta l/\Delta t = 0,004 \div 24$ мышечных длин за секунду, развиваемой силы - до $7 \text{ кг}/\text{см}^2$.

Центральный вопрос в изложенной схеме: **как** генерируется элементарная сила в паре актин-миозин. Современная точка зрения выглядит так. Головка миозина обладает АТФ-азной активностью. В исходном (расслабленном) состоянии актомиозинового комплекса молекулы АТФ находятся в активных центрах головок, в большинстве своём в

гидролизованном состоянии, но с продуктами гидролиза (АДФ и Ф), ещё связанными с активным центром. Это энергетически напряжённое состояние, в котором сосредоточено более половины всей энергии гидролиза АТФ, но оно кинетически заторможено. При поступлении «сигнала» (а это – резкое увеличение активности ионов Ca^{++} в цитоплазме) происходит изменение структуры актиновой нити, и на её поверхности открывается участок, имеющий высокое сродство к миозиновой головке. Ближайшая головка устремляется к этому посадочному месту и образует замкнутый мостик между актиновой и миозиновой нитью с ориентацией оси головки перпендикулярно направлению нитей. Однако структура головки при этом изменяется так, что отделение АДФ и Ф становится возможным. Этот процесс происходит, но при этом основная доля энергии гидролиза высвобождается в виде конформационного перехода в структуре актин-головка-шейка. Переход сопровождается изменением ориентации головки относительно направления мостика, (ось головки поворачивается на 45%). Однако при этом связь мостика с актиновой нитью не разрывается, вследствие чего актиновая нить протягивается относительно миозиновой на величину 10-20 нм, если концы саркомера свободны, или создаёт элементарную силу натяжения, если границы саркомера фиксированы. Релаксированное, но связанное состояние мостика устойчиво и может продолжаться долго, если в цитоплазме нет свободной АТФ. Это состояние ригидности мышцы, характерное для состояния трупного окоченения. При наличии свободных молекул АТФ они садятся на активный центр головки и вызывают её отсоединение от актиновой нити. Начинается гидролиз АТФ, и цикл работы мышцы завершается. Рис. 5. 20. иллюстрирует основные стадии этого цикла.

В рамках описанных представлений сила, развиваемая саркомером, определяется числом головок, способных образовывать мостики и создавать тяговые усилия, и естественным образом зависит от длины саркомера. Рис. 5. 21. поясняет эту зависимость. В сильно растянутом саркомере толстые и тонкие нити не перекрываются, и мостики не образуются. В сильно сжатом саркомере концы толстых нитей упираются в противолежащие Z-диски и тянуть некуда. В промежуточном состоянии сила достигает максимума. Получаемая зависимость согласуется с наблюдаемой реально

Механизм управляющего действия ионов Ca^{++} также находит объяснение (рис. 5. 22).

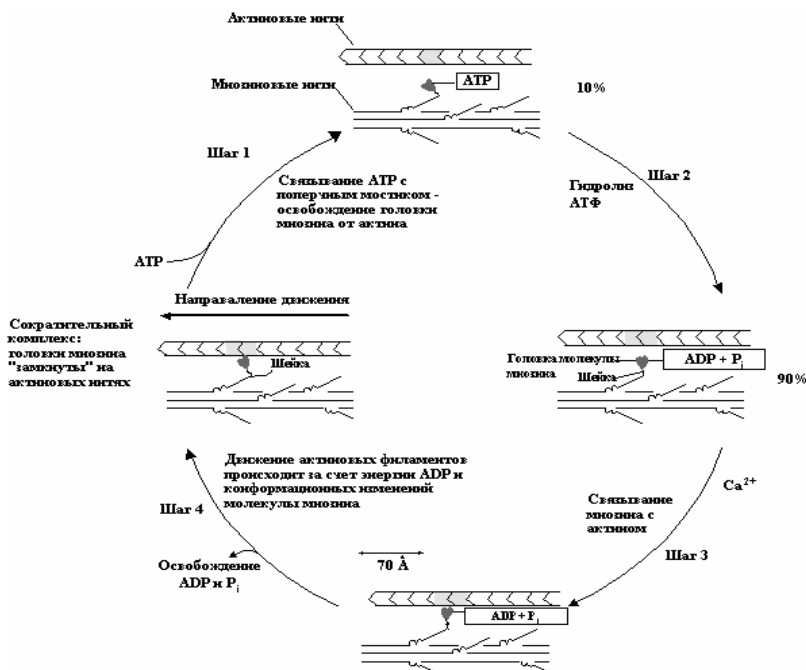


Рис. 5.20. Схема цикла работы актомиозиновых мостиков.

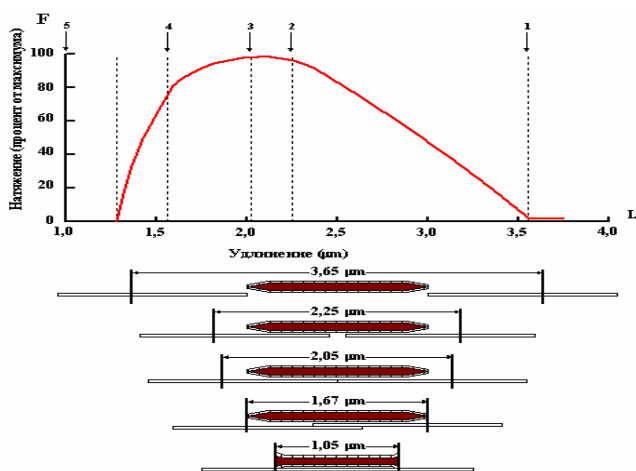


Рис 5. 21. Зависимость силы от степени перекрытия толстых и тонких нитей.

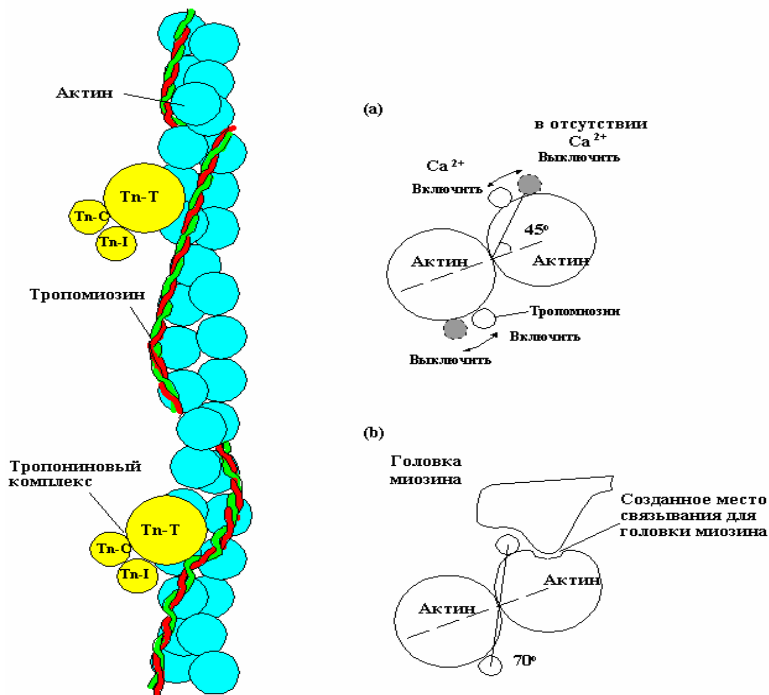


Рис. 5. 22. Схема действия тропонинового комплекса.

На полимере актина вдоль ложбины между двумя нитями находится нить белка тропомиозина. С продольной периодичностью 36 нм на ней располагаются субъединицы тропонинового комплекса, которые прилегают к центру связывания актина с миозиновой головкой. При характерной для цитоплазмы мышечной клетки низкой концентрации ионов кальция порядка 10^{-7} - 10^{-6} М конформация тропонинового комплекса такова, что он прикрывает центр, препятствуя связыванию. Нервный импульс, приходящий к наружной мембране клетки через нервно-мышечный синапс от мотонейрона, охватывает её электрическим возбуждением, которое по специальной мембранной сети «Т-трубочек», отходящей от наружной мембраны, проникает внутрь клетки и передаётся мембране внутренней эндоплазматической сети. Эта сеть состоит из цистерн сложной формы, охватывающих небольшие пучки волокон. Цистерны этой сети наполнены иона-

ми кальция с концентрацией порядка 10^{-4} - 10^{-3} М, а проницаемость их стенок для Ca^{++} зависит от электрического потенциала на ней. В покое проницаемость низкая, но при возбуждении она резко возрастает, и ионы кальция по градиенту концентрации проникают в клетку, поднимая её до уровня 10^{-5} - 10^{-4} М за время порядка 1 мс. При такой концентрации комплекс тропонина испытывает конформационный переход, освобождая центр связывания, и мостик замыкается. По окончании периода возбуждения мембраны, её проницаемость для ионов кальция падает, а постоянно работающие кальциевые насосы эндоплазматической и саркоплазматической мембран быстро (за время около 10 мс) осуществляют «секвестрацию» кальция из саркоплазмы, возвращая концентрацию Ca^{++} к прежнему низкому значению. Так формируется акт одиночного сокращения. Он состоит из замыкания мостиков, взаимной протяжки толстых и тонких нитей на один шаг и размыкания мостиков. Характерные времена процесса определяются в основном диффузией ионов кальция в и из саркоплазмы мышечной клетки и грубо оцениваются соотношением $\tau \sim V^{-3/2}$, где V – объём саркоплазмы.

Энергетическая эффективность работы мышцы достаточно высока. Коэффициент полезного действия цикла работы мостиков, изображённого на рис 5.20, рассчитанный на затраты АТФ, близок к 100%, во всяком случае он более 80%. Затраты энергии на секвестрацию Ca^{++} несколько снижают его (примерно до 70%). Однако в живой покоящейся мышце идёт постоянное потребление энергии, приводящее к её нагреву. В напряжённой мышце, не совершающей работы (изометрический режим), выделение тепла значительно возрастает. Эти процессы снижают реальный к.п.д. мышцы до уровня 40-50%. Следует отметить, однако, что вопросы энергетики функционирования мышцы изучены пока недостаточно.

5.2.2.3. Режимы работы целой мышцы.

В реальных условиях в целой мышце отдельные акты перемещения нитей не синхронизованы, поэтому её сокращение носит плавный характер, отражая средний уровень возбуждения отдельных двигательных единиц. При поступлении серии возбуждающих импульсов мостики, совершают многократные акты замыкания и развития усилий. Если концы волокна свободны, мостики перемещают нити, а с ними и Z – пластинки на макроскопические расстояния. Если длина волокна фиксирована внешними условиями, они развивают длительное напряжение волокна. В соответствии с физиологическими

условиями различают, соответственно, два главных режима работы мышцы: *изотонический* и *изометрический*. В эксперименте они создаются следующим образом.

1. Изотоническое сокращение: мышца нагружена на фиксированную величину, регистрируется её сокращение в ответ на одиночный импульс возбуждения (в лабораторных условиях это может быть электрический импульс, синхронно возбуждающий все волокна мышцы). Получаемый ответ мышцы называют одиночным сокращением. Схема опыта и характерная зависимость величины перемещения груза приведены на рис. 5.23.

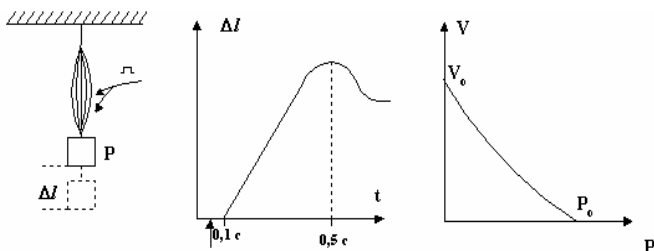


Рис. 5.23. Схема реализации изотонического режима возбуждения.

Скорость сокращения мышцы зависит не только от интенсивности возбуждения, но и от приложенной силы. В частности, при достаточно большой силе усилия, развиваемого мышцей, может оказаться недостаточно для сокращения мышцы. Гиперболическая зависимость между скоростью сокращения мышцы и приложенной силой была установлена А. Хиллом и показана на рис. 5.23. Хилл предложил эмпирическое уравнение для этой гиперболы:

$$(P+a)V=b(P_0-P) \quad \text{или} \quad (P+a)(V+b)=b(P_0+a) \quad (5.78)$$

Здесь P_0 – максимальная (при данной длине) сила, развиваемая мышечным волокном, V_0 – максимальная скорость сокращения легко находится из уравнения Хилла при $P=0$. Это даёт $V_0=bP_0/a$. Поскольку мощность, развиваемая мышцей, определяется произведением силы на скорость сокращения, которое в крайних точках $P=0$ и $v=0$ обращается

ется в 0, то, очевидно, что должна существовать оптимальная сила (и, соответственно, оптимальная скорость) при которой мышца развивает максимальную мощность. Читателю предлагается найти эти величины в качестве упражнения самостоятельно.

Однако, это уравнение Хилла было получено подгонкой под экспериментальные данные. Коэффициенты a и b также подбираются эмпирически. Было много попыток вывести это уравнение теоретически. Лишь сравнительно недавно удалось получить его из простых соображений молекулярной кинетики (В.И Дещеревский).

Пусть n_0 – общее число мостиков в мышце, n – число замкнутых тянущих мостиков m – число «тормозящих» мостиков (тех, которые осуществили акт «протяжки» нитей, но остались соединёнными с актиновыми нитями и уже не тянут, а тормозят). Тогда $n_0 - n - m$ – число свободных мостиков. Пусть k_1 – константа скорости перехода свободного мостика в связанный, k_0 константа скорости перехода тянущего мостика в тормозящий и k_2 константа скорости разрыва мостика. Очевидно, что k_0 можно выразить через скорость скольжения нитей (т. е. скорость сокращения волокна) и длину одного шага: $k_0 = v/l$. Циклическая схема работы мостиков, изображённая на рис. 5.20, позволяет построить граф кинетики процесса (рис. 5.24) и написать кинетические уравнения переходов, рассматривая их как реакции первого порядка:

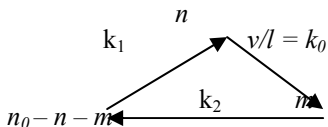


Рис. 5.24. Граф схемы циклической работы мостиков.

$$L_{\pi\pi} = \left. \frac{J_d}{\Delta\pi_s} \right|_{\Delta p=0} \quad (5.79)$$

Запишем уравнение Ньютона:

$$\dot{v} M = P - (nf_0 - f_0 m), \quad (5.80)$$

где P – приложенная внешняя сила, а выражение в скобках – сила, которая развивается мышцей. Здесь принято для простоты, что эле-

ментарные тянущие и тормозящие силы, развиваемые одним мостиком, имеют одинаковую величину f_0 .

Учитывая, что в стационарном состоянии левая часть уравнения Ньютона равна нулю, а также $\dot{n} = 0$, $\dot{m} = 0$, после решения системы алгебраических уравнений получим:

$$\left(P + \frac{k_1 f_0 n_0}{k_1 + k_2} \right) v = \frac{k_1 k_2 l n_0}{k_1 + k_2} (f_0 n_0 - P). \text{ Обозначая } k_1 f_0 n_0 / (k_1 + k_2) = a, \quad k_1 k_2 l n_0 / (k_1 + k_2) = b, \quad f_0 n_0 = P_0, \quad (5.81)$$

получим уравнение Хилла. Полученные соотношения (5.81) раскрывают физический смысл коэффициентов в уравнении Хилла.

Отдельные этапы реальной работы мышцы осуществляются в изотоническом режиме и хорошо описываются уравнением. Однако, P_0 зависит от длины волокна (поскольку от неё зависит число мостиков на перекрывающихся участках актиновых и миозиновых нитей (см. рис. 5.21.), и это затрудняет интерпретацию результатов исследования. Поэтому при экспериментальных научных исследованиях часто предпочитают другой режим работы мышцы.

2. Изометрическое возбуждение: фиксируется длина мышцы и с помощью динамометра регистрируется сила растяжения мышцы в ответ на синхронное возбуждение мышечных волокон (рис. 5.25).

Следует напомнить, что, независимо от режима функционирования мышцы, за её активацией одиночным импульсом следует спонтанная дезактивация. Характерные времена подъёма и спада одиночного напряжения весьма индивидуальны и лежат в интервале от десятков до сотен миллисекунд.

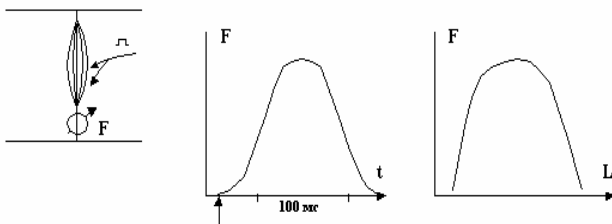


Рис. 5.25. Схема опыта и типичные наблюдаемые результаты в изометрическом режиме исследования. Правый график – экспериментальное проявление, появившейся на рис. 5.21.



Рис. 5.26. Изменение тетануса мышцы при изменении частоты стимуляции.

Результат последовательного возбуждения целой мышцы серией импульсов зависит от силы и частоты возбуждения. На рис. 5.26. показан пример «зубчатого» тетануса, переходящего в «гладкий» с повышением частоты. Этот эффект связан с конечной скоростью дезактивации волокна и наложением последующих возбуждений, когда интервал между ними становится соизмеримым с периодом дезактивации.

В реальных условиях при естественной стимуляции мышц их поведение становится гораздо более сложным, чем в подобных экспериментах. При этом проявляется и несинфазность возбуждения волокон, и гетерогенность геометрии, возбудимости и скорости активации (дезактивации) различных волокон. Проявляется также взаимное перекрывание областей расположения волокон, иннервируемых разными мотонейронами. Совокупность волокон, иннервируемых одним мотонейроном, называют *двигательной единицей*. Пространственное перекрывание двигательных единиц сглаживает опасную пространственную неравномерность внутренних механических напряжений в мышце. Этому же способствует и электрическое взаимодействие близко расположенных волокон, способное иногда передать возбуждение от одной двигательной единицы к другой (эффект «рекрутирования» двигательных единиц).

В мышцах, обеспечивающих работу одного органа или части тела, обычно соседствуют мышцы с разными физиологическими характеристиками. Так, различающиеся по своим скоростным и мощностным способностям «белые» и «красные» мышцы входят в состав одних и тех же мышечных систем. «Белые» быстрые мышцы FT-типа получают энергию из гидролиза внутриклеточных запасов АТФ и креатинфосфата, т.е. анаэробным образом, и способны развивать удельную мощность около 155 Вт на кг своего веса. «Красные» медленные мышцы ST-типа, богатые митохондриями ведут аэробный процесс окисления (их цвет обусловлен гемоглобином в капиллярной

сети) и развивают максимальную мощность на уровне 40 Вт на кг веса. Однако белые мышцы способны удерживать данный уровень мощности всего 6 секунд, а красные мышцы – в сотни раз дольше. От доли белых и красных мышц в целой мышце органа зависят его функциональные способности. Так, например, в икроножной мышце спортсменов спринтеров 60% белых мышц, обеспечивающих мгновенную мощность всей мышцы 120 Вт/кг, у стайеров же в этом органе белых мышц всего 35% , и, соответственно, мощность целой мышцы 95 Вт/кг, но сохраняется на этом уровне достаточно продолжительное время.

Одновременное сочетание силы и скорости сокращения мышцы в каждом конкретном случае является результатом определённого компромисса. Так кузнечик способен «петь» часами, совершая колебания надкрыльями с частотой 200 гц. Это обеспечивается высокой специализацией соответствующих мышечных клеток: 40% их объёма занимают митохондрии , 25% - цистерны саркоплазматического ретикулума и 33% объёма занимают миофибриллы. Для увеличения частоты повторяющихся одинаковых движений, собственная скорость которых лимитируется приведенными выше характерными временами диффузии ионов кальция, природа находит интересные специальные решения. Так, оказалось, что принудительное растяжение мышцы в некоторых случаях создаёт за счёт её упругости обратное сократительное движение в ней. Это используется в механизме, приводящем в движение крылья мухи. Мышечный аппарат этого устройства включает в себя две группы волокон, прикреплённых к упругому тораксу мухи в перпендикулярных друг другу направлениях. При сокращении одной группы волокон деформация торакса вызывает растяжение ортогональной группы, в результате чего возникает их сокращение, растягивающее в свою очередь первую группу волокон, которые также отвечают обратным сокращением без участия нервного импульса и выброса ионов кальция. Высокая добротность колебаний этой механической системы, доходящая до 40, позволяет поддерживать слабо затухающие колебания в течение десятков периодов. Резонанс такой системы приходится на 2 кгц, обеспечивая соответствующую частоту движения крыльев мухи, значительно превосходящую предельную частоту обычного возбуждения волокна через нервно мышечный синапс. При этом происходит также значительная экономия энергии, необходимой для секвестрации ионов кальция.

Гладкая мускулатура в отличие от поперечно-полосатой в основном спонтанно активна (сердце, желудок, кишечник). Однако существуют гладкие мышцы, управляемые нервными сигналами

(мышцы хрусталика глаза и). Правда, в этих случаях движения не являются произвольными, а, как правило, являются частью рефлекторных процессов.

Исследование сложных процессов сокращения мышц и управления этими процессами составляет значительную часть общей и специальной физиологии.

5.3. Биотоки и биопотенциалы.

5.3.1. Общие соображения.

Живая ткань насыщена подвижными зарядами, источниками которых в основном являются соли, легко диссоциирующие в водной среде, и некоторые полиэлектролиты. В таблице 5.3.1 приведены для примера характерные значения концентрации (точнее, активности) ионов в клетках мышцы теплокровных (C_i) и в плазме крови (C_e).

Таблица 5.3.1. Концентрации основных ионов в биологической среде .

C в мМ/л	K^+	Na^+	Cl^-	Ca^{++}	Mg^{++}	HCO_3^-
C_i	155	12	4	10^{-5} - 10^{-4}	10	8
C_e	4	145	120	2	1	27

Точность знания реальных концентраций не очень велика. Уж слишком сложно измерить их в клетке, не возмущая её состояния измерительным прибором. Измерение наружной концентрации несколько проще, но полученное значение не всегда относится к участку среды, непосредственно омывающему клеточную мембрану. По этой причине значения концентраций для одинаковых объектов несколько варьируют у разных авторов. Кроме того, концентрации ионов в различных тканях и у разных животных объективно различаются. Поэтому цифры, приведенные в таблице можно рассматривать как характерные для живых клеток, но ориентировочные.

Электрические токи и потенциалы, распределённые в живом объекте, играют важную роль в жизни каждой клетки и в межклеточной коммуникации. У начинающих изучение биофизики часто складывается мнение, что биопотенциалы создаются непосредственно системами активного транспорта заряженных частиц. Это естественное предположение, но оно не вполне правильно. Действительно, некоторые ионные насосы с несимметричным переносом зарядов, такие как натрий - калиевый насос, вносят некоторый вклад в трансмембранный потенциал на клеточной мембране. Однако главным продуктом работы систем активного транспорта является создание транс-

мембранной разности концентрации частиц, а возникающий электрический потенциал на мембране зависит от свойств мембраны в целом и в большей степени определяется участками мембраны за пределами «насосов». Ситуацию помогает понять рис. 5.27, на котором изображена общая, хотя и сильно упрощённая система процессов в клеточной мембране, определяющая электрический потенциал на мембране.

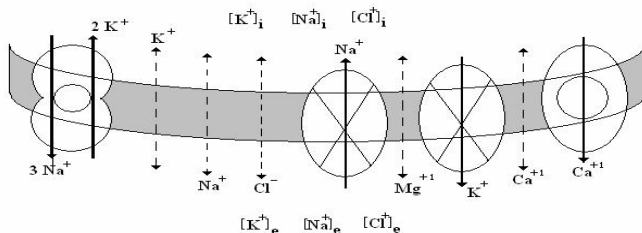


Рис 5.27. Система движения ионов через клеточную мембрану. Здесь показаны натрий калиевый и кальциевый насосы, селективные натриевые и калиевые каналы пассивной проводимости (сплошные стрелки) и пассивная утечка ионов через другие участки мембраны (пунктирные стрелки).

Главными участниками событий, которые влияют на стационарные концентрации ионов внутри и вне клетки, а также на трансмембранный электрический потенциал, являются NaK насос, отчасти Са-насос, потенциалозависимые калиевые и натриевые каналы, а также неспецифические каналы «утечки» ионов сквозь мембрану. Так как все пути пассивного переноса ионов имеют конечную величину проводимости, то «короткое замыкание» мембраны отсутствует. Поэтому при постоянстве активности всех ионов вне клетки (а это обеспечивается практически безграничным объёмом внешней среды) и отсутствии внешних воздействий в клетке должны установиться некоторые стационарные концентрации ионов и соответствующий трансмембранный электрический потенциал, характерный для состояния покоя. Величины установившихся значений концентраций и потенциалов зависят от параметров элементов пассивной проводимости и производительности ионных насосов. Из-за сложной зависимости величин пассивных ионных потоков от электрического потенциала на мембране, с трудом поддающихся аналитическому описанию, расчёт параметров стационарного состояния в общем случае практически не возможен. Поэтому сначала обсудим качественно некоторые важные положения.

Поскольку натрий-калиевый насос электрически несимметричен, (внутри клетки вводится 2 иона калия в обмен на вывод 3 ионов натрия), при его работе клетка непрерывно получает отрицательный заряд и для установления стационарного состояния (а оно реально существует) его избыток должен как-то компенсироваться. Можно было бы предположить, что натриевая проводимость мембраны выше калиевой, и под действием возникшей разности потенциалов ионы натрия пассивно возвращаются в клетку через участки вне насоса и компенсируют суммарный перенос заряда. Однако это не так, проницаемость мембраны для ионов натрия в покое, наоборот, значительно ниже, чем для ионов калия, а при возбуждении, когда через селективные каналы в возбудимых клетках проходят импульсные калиевые и натриевые токи, переносимые ими заряды за время импульса возбуждения в точности равны друг другу. Можно, наоборот, предположить, что постоянный дефицит притока положительного заряда в клетку через насос компенсируется его поступлением с пассивным дополнительным притоком ионов калия сквозь мембрану. Но при том распределении концентраций ионов калия между цитоплазмой и внешней средой и электрическим потенциалом, которые фактически устанавливаются в стационарном состоянии («минус» - внутри), пассивный вход K^+ невозможен. Для объяснения этого недоразумения, которое, впрочем, редко обсуждается в учебной литературе, иногда предполагают, что компенсация этого «лишнего» насосного тока осуществляется выносом из клетки ионов хлора. Действительно, таким способом можно устранить накопление отрицательного заряда в клетке, но при этом возникает материальный разбаланс: в клетке будет накапливаться дефицит ионов натрия и хлора. Для устранения этого недостатка, вероятно, можно постулировать наличие некоторого канала поступления в клетку электронейтральной пары ($Na^+ + Cl^-$), но подобная возможность остаётся пока не изученной.

Далее, необходимо уточнить понятие электрического потенциала клетки, а именно: это разность потенциалов между чем? Ведь внутреннее и, тем более, внеклеточное пространство достаточно протяжённо. Для этого полезно оценить величины дебаевских длин в рассматриваемых средах. Зная концентрацию подвижных зарядов в цитоплазме и в межклеточной среде (это ионы основных электролитов KCl и $NaCl$ с типичной концентрацией (см. табл. 5.3.1) порядка долей моля на литр, т. е. около $5 \cdot 10^{20} \text{ см}^{-3}$) и диэлектрическую проницаемость водной среды ($\epsilon_1 = 81$), получим из () $\delta_1 \approx 0,5 \text{ нм}$. В клеточной мембране оценить концентрацию подвижных зарядов сложно, но её средняя величина не превышает $5 \cdot 10^{16} \text{ см}^{-3}$, а $\epsilon_2 \approx 5$. Это даёт

для $\delta_2 \approx 10$ нм. Воспользуемся критериями, которые были сформулированы в предыдущей главе, для системной оценки решений таких задач. Поскольку дебаевская длина в средах, окружающих мембрану, много меньше протяжённости этих сред, то объёмные заряды сред сосредоточены лишь в областях толщиной $\delta_2 \approx 0,5$ нм, непосредственно прилегающих к мембране. В самой мембране дебаевская длина заметно (как $10 > 5$) превышает толщину мембраны и, значит, поле внутри мембраны практически однородно, а толщина мембраны значительно превосходит дебаевские длины в окружающих средах (как $5 > 2 \cdot 0,5$). Вспоминая задачу, разобрannую в разделе (5.1.1.2), легко понять распределение электрического поля (рис. 5.28.а).

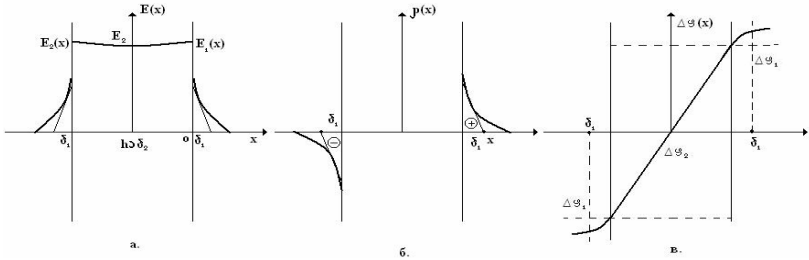


Рис. 5.28.

Так как поле вне мембраны убывает экспоненциально, а на границе мембрана-среда электрическая индукция непрерывна, то величину падения потенциала в среде легко найти:

$$\Delta\varphi_1 = \int E_1(x)dx = (\varepsilon_2/\varepsilon_1)E_2 \int \exp(-x/\delta_1) dx = (\varepsilon_2/\varepsilon_1) E_2 \delta_1. \quad (5.82)$$

Здесь интегралы берутся на интервале от 0 до ∞ . Падение потенциала в мембране толщины h (если поле в ней считать постоянным) равно $\Delta\varphi_2 = hE_2$. Их отношение:

$$\Delta\varphi_1/\Delta\varphi_2 = (\varepsilon_2/\varepsilon_1) (\delta_1/\delta_2) \approx 0,05/16 = 0,003. \quad (5.83)$$

Таким образом, в рамках нашей модели точки, между которыми сосредоточена разность потенциалов между цитоплазмой и окружающей средой, находятся на расстоянии δ_1 по обе стороны от поверхно-

сти мембраны (они показаны на рис. 5.28.б). При этом на самой мембране сосредоточено более 99% всей разности потенциалов, а сама она играет роль конденсатора, обкладками которого являются плотно прилегающие к ней тонкие слои электролита (рис.5.28.в), в которых сосредоточены заряды противоположных знаков (в нашем случае со стороны цитоплазмы - отрицательные). Это представление оказывается полезным во многих случаях.

Схему формирования электрического потенциала на мембране иногда представляют в виде простой электрической цепи (рис:5.29.)

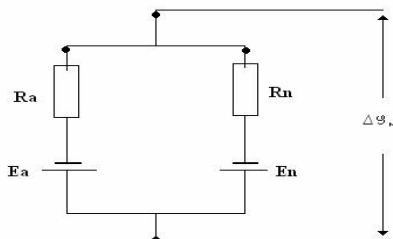


Рис.5.29. Эквивалентная схема биологической мембраны.

Здесь E_a - электродвижущая сила, создаваемая натрий калиевым насосом, R_a - его внутреннее сопротивление, E_n - суммарный диффузионный потенциал подвижных ионов, R_n - эквивалентное сопротивление этого пассивного источника потенциала. Используя уравнение Кирхгофа нетрудно получить для потенциала на мембране $\Delta\varphi$:

$$\Delta\varphi = (E_a R_n + E_n R_a) / (R_a + R_n) \quad (5.84)$$

Эта формула создаёт впечатление возможности рассчитать величину потенциала мембраны, если известны его составляющие. Но величина E_a , отражающая электрогенность насоса, не известна. В свою очередь, вычислить её по этой формуле, используя измеренное значение мембранного потенциала, практически невозможно, т. к. значения сопротивлений точно не известны, (а они не являются постоянными и зависят от потенциала), а от них зависит однозначность решения этой обратной задачи. Так, например, если $R_a \gg R_n$, то вклад E_a в $\Delta\varphi$ будет сильно замаскирован на фоне вклада E_n . Таким образом эквивалентная схема на рис.5.29. мало что даёт практически. Считают, что вклад E_a в $\Delta\varphi$ реально не превышает 5-10 мВ.

5.3.2. Потенциал покоя живой клетки.

С учётом вышесказанного рассмотрим механизм возникновения потенциала клетки относительно окружающей среды. Многочисленные эксперименты показали, что *основными* потенциалоопределяющими ионами являются ионы калия, натрия, отчасти хлора, а в некоторых специальных случаях. — кальция. Фактический потенциал живой клетки отрицательный и имеет величину, лежащую у разных клеток в диапазоне от -40 до -110 мВ. Для мышечной клетки теплокровных, приведенной в начале раздела в качестве типичной, он составляет -90 мВ. В состоянии покоя определяющий вклад в его величину вносят ионы K^+ . В этом состоянии проницаемость мембраны для ионов калия доминирует над другими: $p_{Na^+}/p_{K^+} = 0,02 - 0,025$; $p_{Cl^-}/p_{K^+} = 0,5 - 0,05$. Если идеализировать эту ситуацию и представить, что калиевая проницаемость доминирует неограниченно, то при заданном перепаде концентрации ионов калия внутри и вне клетки на мембране должен установиться термодинамически равновесный потенциал, определяемый формулой Нернста:

$$\Delta\varphi = \varphi_i - \varphi_e = (\kappa T/q) \ln([K^+]_i/[K^+]_e) \quad (5.85)$$

При активностях ионов калия, указанных в табл. 5.2.1, получим $\Delta\varphi = -97$ мВ. Это близко к реальному потенциалу для этой клетки, подтверждая разумность сделанного предположения. Физика процесса установления равновесного электрического потенциала в данных условиях элементарна. Пусть в начальный момент электролиты внутри и вне клетки отличаются концентрацией, но электронейтральны. Под действием разности концентраций возникает диффузионный поток ионов калия наружу. Электронейтральность нарушается, на мембране возникает потенциал, полярность которого (+ внутри, - снаружи) препятствует дальнейшему выходу K^+ наружу. Потенциал Нернста это потенциал, при котором диффузионная и электрическая силы уравниваются.

Подчеркнём, что в равновесии полярность потенциала такова, что + находится там, где положительных ионов (в нашем случае K^+) меньше! На первый взгляд это неожиданно, но не удивительно. Положительные ионы потому и вышли наружу, что в клетке их было больше, чем снаружи. Но отрицательные ионы хлора, которых в клетке тоже больше, чем снаружи, остались, не имея возможности

покинуть клетку. Термодинамически равновесное распределение K^+ соседствует с неравновесным распределением Cl^- .

Заметим сразу, что установление равновесия для ионов калия сопровождается выходом ничтожно малого их количества. Действительно, пусть мембрана, будучи ёмкостью C , при зарядке посредством переноса n однозарядных ионов до потенциала $\Delta\phi$ получила заряд $Q = nq$, где q – элементарный заряд. Эти величины связаны известным соотношением: $C = Q / \Delta\phi$. Ёмкость мембраны в свою очередь равна $\epsilon\epsilon_0 S/d$ (в системе СИ). Количество ионов N в клетке объёмом V равно $[K^+] V$. Для сферической формы клетки радиуса R это соответствует доле перенесенных ионов n/N :

$$n/N = 3\Delta\phi\epsilon\epsilon_0(qdR[K^+]j)^{-1} \quad (5.86)$$

Подставляя характерные значения $\Delta\phi = 90$ мВ, $\epsilon\epsilon_0 \approx 5 \cdot 8,85 \cdot 10^{-12}$ фарад/м, $q = 1,6 \cdot 10^{-19}$ К., $d = 4$ нм, $R \approx 10$ мкм, $[K^+] = 0,15$ мМ/л., получим $n/N = 2 \cdot 10^{-5}$. Таким образом во время установления равновесия численные значения концентраций ионов практически не изменяются относительно указанных в таблице 5.3.1.

Для уточнения полученного в (5.85) значения потенциала покоя клетки необходимо учесть ненулевую проницаемость мембраны для ионов Na^+ и Cl^- . Это принципиально изменяет ситуацию. Равновесный электрический потенциал для заданного распределения ионов натрия, рассчитанный по формуле Нернста оказывается равным + 66 мВ, а для ионов хлора – 90 мВ. Это означает, что не существует значения потенциала, который был бы равновесным для заданного распределения концентраций *всех трёх* типов ионов. В данной системе не может быть термодинамического («статического») равновесия. Возможно лишь возникновение стационарного состояния, при котором устанавливается некий компромиссный потенциал, соответствующий отсутствию переноса заряда, т. е. равенству нулю алгебраической суммы всех ионных токов. Для нахождения этого потенциала воспользуемся решением задачи, рассмотренной в разделе (5.1.1.2).

Решение уравнения Нернста-Планка в предположении постоянного поля для нашего случая (см. формулы 5.38) имеет вид:

$$J_K = P_K \cdot \psi \cdot \frac{K^+ - K_1^+ e^{-\psi}}{e^{-\psi} - 1} \quad (5.87)$$

$$(5.88) \quad J_{Cl} = -P_{Cl} \psi \cdot \frac{Cl_2^- - Cl_1^- e^{-\psi}}{e^{-\psi} - 1} = P_{Cl} \psi \cdot \frac{Cl_2^- e^{-\psi} - Cl_1^-}{e^{-\psi} - 1}. \quad (5.89)$$

В последнем выражении учтено, что ионы хлора имеют отрицательный заряд. Здесь, как и прежде,

$$\psi = \frac{q\varphi}{kT}, \quad \varphi = \varphi_i - \varphi_e. \quad (5.90)$$

Условие отсутствия переноса заряда (условие стационарности) выразится так:

$$J_K + J_{Na} = J_{Cl} \rightarrow P_K(K_2^+ - K_1^+ e^{-\psi}) + P_{Na}(Na_2^+ - Na_1^+ e^{-\psi}) = P_{Cl}(Cl_2^- e^{-\psi} - Cl_1^-) \quad (5.91)$$

Отсюда легко получить:

$$e^{-\psi} = \frac{P_K K_2^+ + P_{Na} Na_2^+ + P_{Cl} Cl_1^-}{P_K K_1^+ + P_{Na} Na_1^+ + P_{Cl} Cl_2^-} \quad (5.92)$$

Наконец, логарифмируя обе части равенства, получим окончательно:

$$\varphi = -\frac{kT}{q} \ln \frac{P_K K_2^+ + P_{Na} Na_2^+ + P_{Cl} Cl_1^-}{P_K K_1^+ + P_{Na} Na_1^+ + P_{Cl} Cl_2^-} \quad (5.93).$$

Во всех формулах здесь индекс 1 относится к внешней среде, индекс 2 – к цитоплазме. Выражение (5.93) называется формулой Гольдмана. Эта формула является естественным обобщением равновесного случая на стационарный. При устремлении показателей проницаемости двух ионов к нулю, формула Гольдмана переходит в формулу Нернста для оставшегося третьего иона. Полезно подчеркнуть важное отличие этих двух формул: в формуле Нернста потенциал не зависит от коэффициента проницаемости, а в формуле Гольдмана потенциал *зависит* от всех проницаемостей. При увеличении коэффициента проницаемости мембраны для какого-то иона стационарный потенциал сдвигается по направлению к значению равновесного потенциала для этого иона. Равновесное значение натриевого потенциала равно + 66 мВ, поэтому увеличение натриевой проницаемости (или уменьшение калиевой) вызывает сдвиг потенциала в сторону положительных зна-

чений, т. е. уменьшение его по абсолютной величине. Это называют «деполяризацией» мембраны. При увеличении калиевой проницаемости или снижении натриевой происходит «гиперполяризация» мембраны, и потенциал ещё больше приближается к равновесному для ионов калия (-97 мВ). Равновесный потенциал для ионов хлора (-90 мВ) почти точно совпадает с реальным стационарным значением мембранного потенциала. Значит, распределение ионов хлора является равновесным, и стационарный потенциал клетки весьма слабо зависит от хлорной проницаемости. Указанные зависимости играют важную роль в физиологии клетки. Они лежат в основе механизмов управления возбудимости клеток, их адаптации, кратковременной памяти и чувствительности к воздействию внешних факторов, специфически изменяющих проницаемость клеточных мембран.

5.3.3. Потенциал действия.

Среди факторов, влияющих на проницаемость мембраны для различных ионов, важное место занимает сам мембранный потенциал. Факт зависимости проницаемости от потенциала не является удивительным. Селективная проницаемость мембраны обеспечивается трансмембранными каналами, создаваемыми белками. Элементы структуры белков несут на себе электрические заряды и диполи, которые испытывают воздействия электрического поля мембраны, меняя своё положение или ориентацию. А электрическое поле в мембране достаточно сильное: 90 мВ на толщине мембраны $4 - 5$ нм создают напряжённость $2 \cdot 10^7$ В/м. Такие каналы относятся к классу потенциалорегулируемых. Схема его устройства приведена на рис. 5. 30.

Потенциалорегулируемый канал

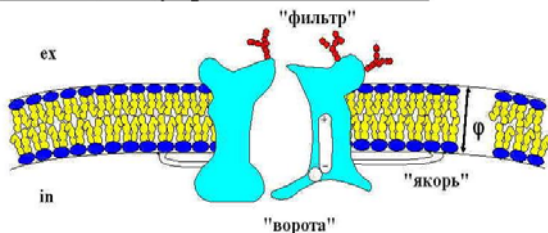


Рис. 5.30. Схема потенциалорегулируемого канала.

Особенно сильной зависимостью от потенциала обладают натриевые каналы. Эта зависимость такова, что P_{Na^+} при любой гипер-

поляризации и умеренной деполяризации остаётся практически неизменным. При устранении первичного возмущения в этом диапазоне потенциал постепенно возвращается к исходному значению. Экспоненциальная кинетика этого возврата соответствует кинетике разряда конденсатора через постоянное сопротивление утечки с характерным временем, равным RC . Однако, если потенциал превышает критическое значение в районе $-(45 - 40)$ мВ, начинается резкое раскрытие натриевых каналов, и P_{Na+} приобретает доминирующее значение: P_{Na+}/P_{K+} достигает величины около 20 или более. При этом мембранный потенциал устремляется к значению равновесного натриевого потенциала ($+66$ мВ). Однако зависимость $P_{Na+}(\varphi, t)$ такова, что при приближении потенциала к равновесному значению натриевые каналы вновь закрываются, вход ионов натрия в клетку прекращается и рост потенциала останавливается в районе значения $+45$ мВ. Калиевые каналы остаются открытыми и даже слегка приоткрываются дополнительно. А так как потенциал мембраны после открытия натриевых каналов стал для ионов калия сильно неравновесным, то вытекающий поток ионов калия достигает значительной величины и сдвигает потенциал к отрицательному стационарному значению. Калиевые каналы обладают некоторой инерционностью и какое-то время сохраняют повышенную проводимость, приобретенную при положительных значениях потенциала. Поэтому достигнутое стационарное значение мембранного потенциала почти точно соответствует равновесному значению калиевого потенциала (-97 мВ). Релаксация натриевых каналов к прежнему состоянию занимает немного более миллисекунды, после чего потенциал возвращается к исходному значению потенциала покоя. Описанная эволюция мембранного потенциала называется *потенциалом действия*. Вид его приведен на рис.5.31.

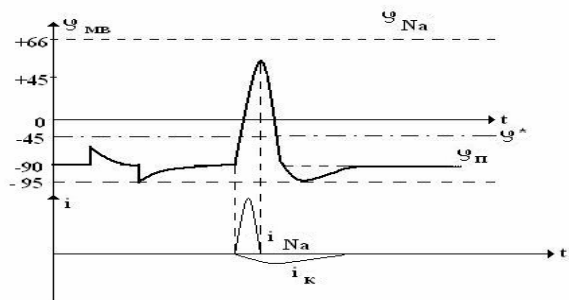


Рис. 5.31. Поведение потенциала клетки при его возмущении. В левой части - релаксация потенциала при подпороговом возмущении. В средней части – потенциал действия, в нижней части - натриевый и калиевый токи.

Здесь же показаны кинетические кривые ионных токов. Восходящая часть потенциала действия почти целиком обусловлена перезарядкой ёмкости мембраны зарядом, внесённым ионами натрия за время до закрытия натриевых каналов. Вклад ионов калия на этом этапе считают несущественным, но последующая релаксация потенциала целиком обусловлена потоком ионов калия. К моменту возвращения потенциала на прежнее стационарное значение заряд, перенесённый ионами калия, полностью компенсирует заряд, внесённый ионами натрия. Поддержание зарядового динамического равновесия обеспечивается оставшимися пассивными электродиффузионными токами всех ионов. Непрерывно работающий натрий-калиевый ток восстанавливает материальный баланс ионов в клетке. Он же является единственным источником энергии, которая диссипируется во время потенциала действия. Все потоки ионов во время спайка являются пассивными, т. к. обусловлены электрохимическим потенциалом, создаваемым на мембране непрерывно работающим натрий-калиевым насосом. А сам спайк является релаксацией потенциала при переходе от почти равновесного состояния для ионов калия к почти равновесному состоянию для ионов натрия и обратно.

С начала развития потенциала действия и до его окончания мембрана не способна к повторному возбуждению. Этот период называют периодом абсолютной рефрактерности. Вслед за ним длится период относительной рефрактерности, в который возбуждение возможно, но требует более интенсивного воздействия на потенциал покоя. Через некоторое время, исчисляемое миллисекундами, порог возбуждения снижается до прежнего минимального уровня. От величины полного периода рефрактерности мембраны зависит максимальная частота возбуждения потенциала действия. Эти величины различаются у разных клеток. Максимальная частота сокращения у теплокровных составляет 180 – 200 гц.

Математическая задача о зависимости эволюции $\varphi(t)$ в потенциале действия нелинейна по своей сути, ведь проводимость каналов, формирующая изменение потенциала, сама зависит от потенциала. Рассматривая мембрану как электрическую ёмкость, заряжаемую трансмембранным током получим «простое» уравнение:

$$C_m d\varphi/dt = - i_m, \quad (5.94)$$

где C_m – ёмкость мембраны на единицу её поверхности, i_m – плотность трансмембранного тока. Следуя идеям Ходжкина и Хаксли, представим мембранные ток в виде суммы токов ионов калия (i_K), натрия (i_{Na}) через селективные каналы и прочих токов утечки (i_L)

$$i_m = i_K + i_{Na} + i_L \quad (5.95)$$

Ток утечки может менять направление в зависимости от величины потенциала. Представим его так:

$$i_L = g_L (\varphi - \varphi_L), \quad (5.96)$$

где φ_L – потенциал реверсии тока утечки, а g_L – эмпирический коэффициент с размерностью электропроводности через единицу площади мембраны. Аналогично представим и токи через селективные каналы:

$$i_K = g_K(t, \varphi) (\varphi - \varphi_K) \quad (5.97),$$

$$i_{Na} = g_{Na}(t, \varphi) (\varphi - \varphi_{Na}) \quad (5.98).$$

Здесь φ_K и φ_{Na} – потенциалы Нернста для ионов калия и натрия, соответственно. Второй множитель в этих формулах естественным образом представляет первый член разложения по отклонению потенциала от равновесного значения в выражении для зависимости тока через открытый канал от потенциала, а множитель $g(t, \varphi)$ отражает вероятность открытия канала. Эта функция была определена экспериментально в результате тщательно поставленных экспериментов с отдельными нейронами. Ряд приёмов позволил избирательно блокировать работу натриевых или калиевых каналов, и разделить вклад различных ионов в общий ток. Измерения кинетики токов через селективные каналы и токов утечки при небольших приращениях потенциалов в районе фиксированных их значений дало авторам этого огромного труда богатый материал. Его скрупулёзный анализ уточнил представления о процессах открытия и закрытия селективных каналов. В частности поведение калиевого канала удалось описать кинетической моделью, в которой предполагается одновременное, но независимое перемещение в электрическом поле мембраны четырёх частиц в положение, соответствующее открытому состоянию канала. Для описания кинетики поведения натриевого канала пришлось пред-

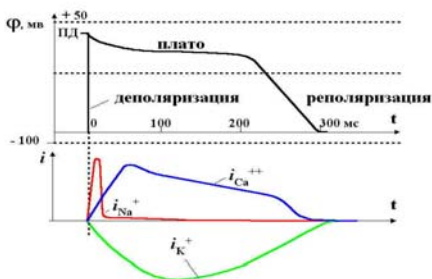
положить встречное перемещение частиц 2 видов: трёх частиц одного вида в сторону открывания канала и одной частицы в сторону закрывания канала. При этом вероятность открытого состояния канала определяется произведением вероятности благоприятного положения всех частиц, участвующих в перемещении, индуцированном электрическим полем. Этих предположений оказалось достаточно, чтобы эмпирически описать зависимость вероятностей благоприятного положения всех трёх видов частиц в функции от потенциала и времени. Общее выражение для токов проводимости получило следующий вид:

$$i_M = g_L (\varphi - \varphi_L) + g_{K0} n^4(t, \varphi) (\varphi - \varphi_K) + g_{Na0} m^3(t, \varphi) h(t, \varphi) (\varphi - \varphi_{Na}) \quad (5.99)$$

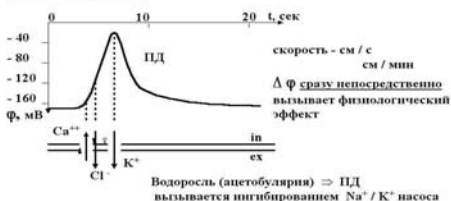
где g_{K0} и g_{Na0} – уже просто численные коэффициенты, определяющие масштаб проводимости каналов. Вид функций m , n и h весьма сложен, и мы не будем его приводить. Подстановка выражения (5.99) в уравнение (5.94) делает его нелинейным, но полностью определяет математическую постановку задачи. Численное решение его дало вид потенциала действия достаточно хорошо соответствующий экспериментальному, приведенному на рис (5.31). Работа Ходжкина и Хаксли была удостоена Нобелевской премии.

Рассмотренный вид потенциала действия является типичным, но не единственно возможным. Во многих случаях ПД отличаются не только величинами, но и формой. Особенно показательны потенциалы действия в клетках сердечной мышцы – миоцитах и клетках растений (рис.5.32).

Потенциал действия (ПД) в миоцитах



ПД в растениях



Водоросль (ацетобулария) ⇒ ПД
вызывается ингибированием Na^{+} / K^{+} насоса

Рис. 5.32. Потенциал действия и ионные токи в миоцитах и в клетках растений.

Значительное влияние на форму ПД в миоцитах оказывает кальциевый ток, втекающий в миоцит и имеющий существенное значение для инициирования механической активности клетки. При переходе потенциала клетки в положительную область, что, как и в других клетках, обусловлено натриевым входящим током, открываются кальциевые каналы и Ca^{++} устремляется в цитоплазму. Продолжительный период присутствия ионов кальция в клетке удлиняет положительную фазу потенциала действия до сотен мсек в отличие от типичного случая.

Что касается потенциалов действия в растениях, то они также имеют свои особенности. Во-первых, в растениях нет нейронов, но подобие потенциала действия проявляется в виде потенциалов, распространяющихся по мелким пучковым клеткам флоэмы и протоксилемы, вероятно специально для этого предназначенных. Во-вторых, появление потенциала действия инициируется, как правило, втекающим током Ca^{++} под действием диффузионного потенциала, когда кальциевая проницаемость мембраны увеличивается под воздействием внешнего фактора (изменение температуры, освещения и т. п.). В положительной области потенциалов клеток вслед за открытием

кальциевых каналов открываются хлорные каналы и ионы хлора выходят наружу под действием своего диффузионного потенциала. Оба этих тока смещают потенциал клеток в положительную сторону, что приводит к открытию калиевых каналов. Калий выходит наружу по своему диффузионному потенциалу и реполяризует мембрану до исходного уровня. В восстановлении исходного состояния некоторую роль играет и протонный насос. Продолжительность этого хода потенциала занимает секунды, а иногда и минуты, а перемещение его по пучковым клеткам происходит со скоростью на порядки меньшей, чем по нейронам животных. Потенциалы действия в растениях имеют одиночный характер, его амплитуда составляет примерно 50 мВ. И, наконец, в третьих, продолжительный период ПД приводит к тому, что в окрестности этого события успевают заметно измениться концентрации ионов кальция, калия и хлора, что оказывает непосредственное действие на биохимические процессы в данном месте. Поэтому ПД в растениях играет не столько сигнальную роль, сколько непосредственно управляющую.

5.3.4. Распространение нервного импульса.

Первоначальное возмущение мембраны, приводящее к локальному изменению её проницаемости, может стать существенным для клетки в целом, если оно достаточно мощное. А именно, первоначальное изменение количества ионов натрия в клетке должно быть достаточно большим, чтобы после растекания их по прилегающему объёму клетки вызвать сдвиг потенциала соседних участков мембраны, достаточный для преодоления порога их электрического возбуждения. Если это условие выполнено, то возникает электрическое возбуждение клетки в целом в виде потенциала действия, который мы рассмотрели. Синхронность возбуждения различных участков клеточной мембраны определяется соотношением между продолжительностью локального спайка и временами перераспределения концентрации ионов и раскрытия натриевых каналов. Последнее при размерах клетки порядка нескольких микрон исчисляется долями миллисекунд. Поэтому такие компактные клетки фактически возбуждаются как единое целое. Иначе обстоит дело с нейронами, имеющими протяжённые участки в виде дендритов и аксонов, длина которых может достигать метров. В таких системах процесс перемещения возбуждения занимает время, заметно большее продолжительности локального спайка. Это проявляется в ограниченности скорости распространения

потенциала действия по протяжённым участкам клетки, легко наблюдаемой экспериментально.

Аналитическое решение задачи о форме и скорости распространении потенциала действия по вытянутому длинному участку нейрона цилиндрической формы очень сложно из-за нелинейности задачи. Поэтому сначала уясним суть проблемы, рассмотрев элементарные явления. Исследуем сначала стационарный случай распределения потенциала по тонкому вытянутому участку нейрона. Смоделируем наш объект исследования длинным цилиндром, заполненным электролитом, с тонкой слабопроводящей оболочкой и окружённым большим объёмом электролита (рис.5.33).

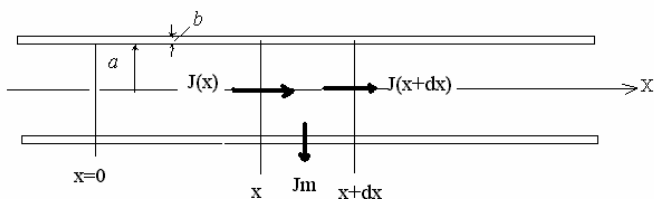


Рис. 5.33. Схема аксона в однородной внешней среде с удельной электропроводностью σ_e . Удельная проводимость аксоплазмы — σ_a , мембраны — σ_m . В плоскости $x = 0$ задан потенциал ϕ_0 .

Для реального аксона толщины мембраны $b \approx 10$ нм $\ll a \approx 100$ мкм (радиус аксона), а удельные проводимости внешней среды, аксоплазмы и материала мембраны связаны соотношением: $\sigma_e > \sigma_a \gg \sigma_m$. Это означает, что дебаевские длины в электролитах значительно меньше дебаевской длины в мембране и потенциал в любой плоскости $x = \text{const.}$ по радиусу не меняется, испытывает скачок на мембране и вновь не изменяется на разумных удалениях от мембраны. Найдём распределение потенциала вдоль оси x , если его значение задано в плоскости $x = 0$ и равно ϕ_0 . Выделим две плоскости, разделённые расстоянием dx , и запишем баланс токов, втекающих и вытекающих из участка между плоскостями:

$$J(x) - J(x+dx) = J_m(x) \quad (5.100)$$

В свою очередь

$$J(x) = \pi a^2 \sigma_a (-d\varphi/dx)_x, \quad J(x+dx) = \pi a^2 \sigma_a (-d\varphi/dx)_{x+dx}, \quad J_m = 2\pi a \, dx \, \sigma_m \varphi(x)/b \quad (5.101).$$

Подставляя (5.101) в (5.100) и устремляя dx к нулю, получим:

$$d^2\varphi/dx^2 = (2\sigma_m/ab\sigma_a) \varphi \quad (5.102)$$

Его решение:

$$\varphi = \varphi_{01} e^{-x/\lambda} + \varphi_{02} e^{x/\lambda}, \quad (5.103)$$

где

$$\lambda = (ab\sigma_a/2\sigma_m)^{1/2} = (r_m/r_a)^{1/2}, \quad r_a = (\pi a^2 \sigma_a)^{-1}, \quad r_m = b(2\pi a \sigma_m)^{-1} \quad (5.104)$$

По смыслу r_a – это продольное сопротивление аксоплазмы на единицу длины аксона, а r_m – поперечное сопротивление мембраны на единицу длины аксона. Т. к. при $x \rightarrow +\infty$ потенциал остаётся ограниченным, то весовой вклад второго экспоненциального члена в (5.103) в области $x > 0$ должен быть равным нулю. При $x = 0$ $\varphi = \varphi_0$, поэтому то окончательный вид решения:

$$\varphi = \varphi_0 e^{-x/\lambda} \quad (5.105).$$

В области $x < 0$, наоборот, решение выражается первым экспоненциальным членом. Это экспоненциальное затухание возмущения потенциала по мере удаления от точки его локализации с характерной длиной λ . Выражение (5.104) позволяет заключить, что затухание потенциала с расстоянием растёт с уменьшением радиуса аксона (т. е. с ростом продольного сопротивления аксоплазмы) и с увеличением удельной электропроводности мембраны и с уменьшением её толщины (т. е. с ростом трансмембранной проводимости мембраны).

Мы решили задачу о *статическом* распределении *подпорогового* (когда σ_m постоянно) возмущения потенциала по оси аксона и не затрагивали вопрос о *скорости* распространения возмущения по аксону. Но величина λ должна иметь положительную корреляцию скорости распространения потенциала действия, если он возникает в каком-то месте аксона. Действительно, чем больше λ , тем на большее расстояние простирается локальное возмущение и тем на большем расстоянии от первоначального может возникнуть потенциал действия, если возмущение потенциала превосходит критическое значение. Таким простым путём можно получить представление о том, как скорость движения потенциала действия зависит от геометрии и электри-

ческих параметров аксона. Сформулировать точно задачу для описания формы и скорости распространения потенциала действия несложно. Для этого достаточно в уравнение (5.100) внести в $J_m(x)$ наряду с током проводимости ещё и ток смещения $C_m d\phi/dt$ (где C_m – ёмкость единицы длины мембраны), т. к. потенциал теперь зависит от времени. При этом уравнение (5.102) заменится на

$$r_a^{-1} d^2\phi/dx^2 = J_m + C_m d\phi/dt \quad (5.106)$$

Но простой ток проводимости через мембрану теперь нужно заменить на ток с учётом раскрытия селективных каналов, который описывается уравнением (5.99). В результате уравнение (5.102) заменится на гораздо более сложное:

$$r_a^{-1} d^2\phi/dx^2 = g_L (\phi - \phi_L) + g_{K0} n^4(t, \phi) (\phi - \phi_K) + g_{Na0} m^3(t, \phi) h(t, \phi) (\phi - \phi_{Na}) + C_m d\phi/dt \quad (5.107)$$

Его численное решение было получено Ходжкиным и Хаксли и дало разумные результаты, согласующиеся с экспериментальными наблюдениями. В частности для параметров, реально описывающих свойства гигантского аксона кальмара, скорость распространения потенциала действия составила примерно 22 м/сек. Мы не будем здесь останавливаться на других подходах к определению скорости движения импульса по волокну, отметим только, что рассмотрение этого явления как электрохимического процесса в длинном коаксиальном кабеле с конечным внутренним сопротивлением и возбудимой оболочкой с конечным сопротивлением утечки, позволяет правильно оценивать зависимость скорости движения возбуждения от параметров «кабеля». Так, вывод о связи скорости передачи сигнала с сопротивлением утечки оболочки кабеля, который мы сделали вначале, вполне применим к анализу явлений в миелинизированном волокне. Такие волокна отличаются от рассмотренных нами наличием поверх мембраны дополнительного слоя из плоских «швановских» клеток, сильно снижающих электрическую проводимость изолирующей оболочки кабеля. В полном соответствии с предсказаниями нашей простой модели (увеличение параметра λ), это сильно увеличивает область «расплывания» локального возмущения. Миелиновая оболочка прерывается узкими разрывами, оставляющими открытыми места соприкосновения «голой» мембраны аксона с окружающим раствором («перехваты Ранвье»). Расстояния между ними не превышает величину λ , поэтому

в этих участках происходит возбуждение мембраны, а возникший здесь натриевый ток “дотягивается” до следующего перехвата, возбуждая и его. Так возбуждение скачками перемещается вдоль аксона с высокой средней скоростью. Этот способ ускорения движения потенциала действия является хорошей альтернативой другому способу ускорения за счёт увеличения внутреннего диаметра аксона и широко используется в живых системах, когда требуется высокая скорость передачи сигналов. Отметим также, что нервное волокно, как и обычный кабель одинаково хорошо проводит импульсы в обе стороны. Но наличие эффекта рефрактерности, свойственное нервному волокну, исключает движение импульса по участку, который недавно был возбуждён и находится ещё в стадии рефрактерности, в том числе исключает и ретроградное (обратное) движение. Поэтому по нервным волокнам передача импульсов всегда происходит от источника возбуждения: от начала дендрита к телу нейрона и от тела нейрона к окончанию аксона.

Передача потенциалов действия по нервным волокнам лежит в основе процесса быстрой передачи информации в нервной системе на большие расстояния без затухания. Потенциал действия (ПД) имеет стандартную форму и не изменяется при движении, а информация заключается только в самом факте возникновения ПД или, чаще, в частоте следования ПД. При этом часто источником импульсов ПД является нейрон, находящийся в состоянии постоянной ритмической активности, а специфические воздействия на него, приводящие к гипо- или гиперполяризации его, соответственно, увеличивают или уменьшают частоту его спонтанной активности.

5.3.5. Межклеточные перенос потенциала действия.

Процесс переноса возбуждения от одной клетки к другой является важным элементом в системе передачи, модуляции и преобразования информации в нервной системе. Место сигнального контакта клеток называется *синапсом*. Он представляет собой тонкую щель, разделяющую концевую мембрану клетки, являющейся источником сигнала (это, так называемая, *пресинаптическая* мембрана), и мембрану принимающей клетки (*постсинаптическая* мембрана). Различают три типа синапсов: *электрические, химические и смешанные* (рис.5.34)

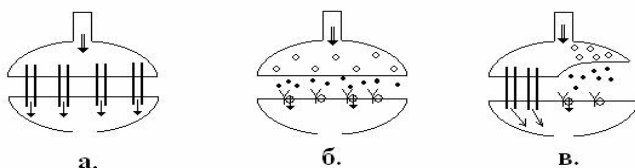


Рис.5.34. Типы синапсов: а – электрический, б – химический, в – смешанный.

Вообще говоря, все типы синапсов передают электрический сигнал. Но в электрическом типе синапса электрический потенциал передаётся непосредственно потоком ионов (т. е. электрическим током) через специальные поры между контактирующими мембранами *пре-* и *пост*синаптических клеток, а в химическом синапсе посредником в межклеточной передаче возбуждения служит специальный химический процесс в синаптической щели.

Электрический синапс имеет самую малую ширину щели (2 – 3) нм и не вносит задержки в процессе передачи сигнала. Как правило, он симметричен, и, в принципе, одинаково хорошо передаёт ток в обе стороны, хотя есть его разновидности, обладающие односторонней проводимостью. Поскольку потенциал действия, приходящий к пресинаптической мембране, имеет положительную полярность, то через синаптические каналы в постсинаптическую клетку проникают положительные ионы. Вызывая положительный сдвиг потенциала покоя (ПП) постсинаптической мембраны (деполяризацию), это воздействие имеет возбуждающий характер. Возникающий потенциал носит название ВПСП – возбуждающий постсинаптический потенциал.

Химический синапс имеет значительно большую ширину щели, до 50 нм, и создаёт заметную задержку при передаче сигнала ($\geq 0,3$ мсек). В щели происходят биохимические реакции, приводящие к изменению проницаемости постсинаптической мембраны и, как следствие, к изменению её потенциала покоя. Увеличение натриевой проницаемости (иногда кальциевой) вызывают деполяризацию постсинаптической мембраны и генерирует ВПСП. Если преобладает рост калиевой или хлорной проницаемости, то происходит гиперполяризация постсинаптической мембраны и развивается ТПСП – тормозящий постсинаптический потенциал. Процесс передачи сигнала через химический синапс начинается с выброса в синаптическую щель из пресинаптического окончания специфического медиатора. Медиатор не-

прерывно синтезируется в теле аксона и накапливается в его окончании в области, прилегающей к синапсу. Когда на концевую мембрану аксона поступает ПД и на ней оказывается положительный потенциал, то проницаемость мембраны к ионам кальция возрастает. Равновесный потенциал для перепада концентрации Ca^{++} на мембране (см. табл. 5.3.1) равен $(kT/2e) \ln C^{++}_e / C^{++}_i = + (110 - 160)$ мВ. т. е. значительно более положительный, чем ПД, поэтому ионы кальция устремляются в цитоплазму несмотря на положительный знак потенциала внутри клетки. В присутствии Ca^{++} пузырьки с медиатором слипаются с мембраной изнутри, встраиваются в неё, а медиатор выходит в синаптическую щель. Далее, после этого экзоцитоза он диффундирует к постсинаптической мембране и взаимодействует с молекулярными рецепторами на её поверхности. Следствием этого является изменение проницаемости мембраны к каким-либо ионам и сдвиг потенциала постсинаптической мембраны. На проведение одного импульса через синапс в щель вводится около 10^6 молекул ацетилхолина. Временный характер этого изменения обеспечивается обратимостью процесса связывания медиатора со своим рецептором и присутствием в синаптической щели фермента, который расщепляет медиатор, заканчивая акт передачи. Часто, в том числе в нервномышечных синапсах, медиатором служит ацетилхолин, его ингибитором – ацетилхолинэстераза, вызывающая его быстрый (за 40 мкмс) гидролиз. В итоге через синапсы могут проходить до 1000 импульсов в секунду. Продукты гидролиза способны диффундировать внутрь аксона, где используются для ресинтеза ацетилхолина. Обнаружено два типа ацетилхолиновых рецепторов на постсинаптической мембране. Они различаются сродством к конкурентам ацетилхолина: *никотину* и *мускарину*. Никотиновые рецепторы локализуются в синапсах нейронов с мышечными клетками и входят в состав прямо хемоуправляемых каналов, в которых ацетилхолин непосредственно влияет на состояние ионного канала и обеспечивают относительно высокое быстрое действие. Типичная схема такого канала показана на рис. 5.35.

Прямо-хемоуправляемый канал

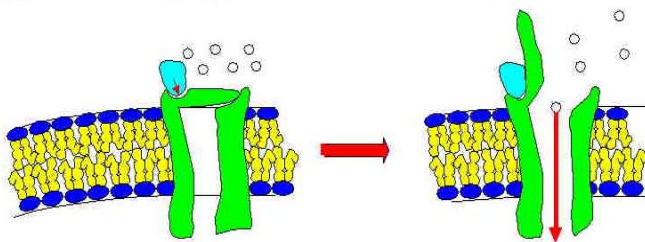


Рис 5.35. Прямо-хемоуправляемый канал. Индуктор, соединяясь с рецептором, вызывает конформационный переход, приводящий к открытию канала. После открытия канала сродство рецептора к индуктору падает и он отделяется от рецептора.

Мускариновые рецепторы характерны для синапсов симпатической нервной системы и некоторых отделов коры головного мозга. Они являются частью косвенно-хемоуправляемых каналов (рис. 5.36).

Косвенно-хемоуправляемый канал

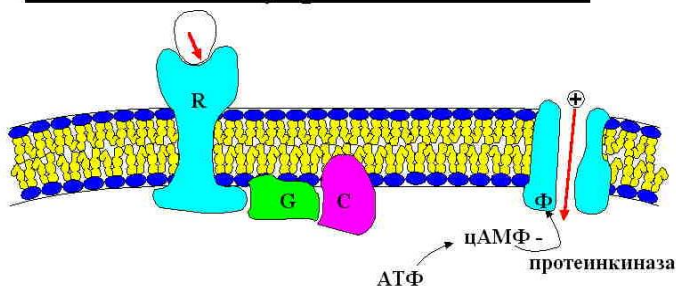


Рис. 5. 36. Косвенно-хемоуправляемый канал. Состоит из нескольких белковых фракций. На *R*-белок садится индуктор, вызывая конформационные изменения этого белка. *R*-белок «механически» взаимодействует с *G*-белком, который, в свою очередь, взаимодействует с *C*-белком. *C*-белок осуществляет реакцию $ATФ \rightarrow \text{цАМФ} + 2\text{Ф}$ и активизирует протеинкиназу, которая присоединяет Ф к белку-каналу, после чего канал открывается.

Взаимодействие рецептора с ацетилхолином порождает длинную цепь реакций внутри клетки, приводящую к изменению проницаемости калиевых и хлорных каналов в мембране за пределами синаптической

щели. Этот процесс характеризуется большими временами развития и сохранения (секунды и даже минуты).

Медиаторы передачи сигналов через синапсы составляют большой класс соединений, ацетилхолин – лишь один из них. Сюда входят некоторые аминокислоты: глицин – тормозной медиатор для мотонейронов, аминomásляная кислота (ГАМК) – главный тормозной медиатор центральной нервной системы, глутамат – её основной возбуждающий медиатор, моноамины: дофамин, адреналин, норадреналин, пептиды: энкефалины, ангиотензин, соматостатин. Возбуждающий или тормозящий характер действия медиаторов определяется не столько их химическими свойствами, сколько свойствами каналов, на которые они воздействуют.

Важная роль в работе синапсов принадлежит соединениям, которые играют роль модуляторов действия синапсов. В особенности это относится к химическим синапсам. Имея много участников процесса передачи сигнала, они естественным образом проявляют чувствительность к воздействию разнообразных факторов. Так например, вещества, конкурирующие за места связывания медиатора с соответствующими мембранными рецепторами, но не влияющие при этом на состояния каналов, могут ослабить или полностью заблокировать передачу сигнала. В последнем случае будет наблюдаться паралич соответствующего органа. Известный яд кураре действует именно по этому механизму. Противоположный эффект судорожной активности органа вызывают вещества (например, эзерин), оказывающие ингибирующие действие на активность ацетилхолинэстеразы, т. к. они импульсный сигнал превращают в непрерывно действующий. Иногда такие противоположные эффекты удаётся взаимно скомпенсировать с терапевтической целью. Подобная модуляция является инструментом управления потоками нервных импульсов в живом организме.

Синапсы являются важным звеном в процессах адаптации, обучения и формирования памяти. Так например, при прохождении высокочастотной серии импульсов через синапс можно наблюдать «синаптическое облегчение», когда при прочих равных условиях постепенно заметно возрастает величина ВПСП или, наоборот, «синаптическая депрессия», когда при длительной ритмической импульсации происходит потеря чувствительности постсинаптического потенциала к ПД на пресинаптической мембране. Первое явление объясняют постепенным накоплением в цитоплазме аксона ионов кальция, отвечающих за слияние пузырьков с ацетилхолином с мембраной и выход медиатора в синаптическую щель. При этом реакция рецепторов постсинаптической мембраны на ПД в аксоне, становится всё бо-

лее энергичной. Во втором случае более заметным становится обеднение окончания аксона пузырьками с ацетилхолином и постепенное снижение эффективности реакции в синапсе на ПД. Эти процессы можно рассматривать как элементарные стадии процесса обучения: «потенциации» и «привыкания», соответственно.

Элементы синаптических систем являются также мишенью для многих специальных фармакологических воздействий в физиологических экспериментах и в медицинской терапии.

Синапсы смешанного типа также обладают высокой пластичностью своих свойств. Постоянный характер передачи сигнала в электрической компоненте синапса сочетается здесь с модулируемым характером функционирования химической компоненты.

Наряду с рассмотренными типами простых синаптических связей двух клеток в реальных системах широко представлены варианты множественных синапсов, когда один аксон (или его разные ветви) формирует синапсы сразу с несколькими клетками и, наоборот, одна клетка имеет несколько синапсов с разными аксонами. При этом часть синаптических связей может быть возбуждающими, другая – тормозящими, а токи, возбуждаемые в постсинаптических мембранах, суммируются алгебраически. В таких групповых соединениях характер и сила отклика постсинаптической клетки сложным, но вполне определённым образом для каждого типа соединения, зависит от силы и совпадения во времени ПД от всех нейронов. Такие устройства способны решать достаточно сложные логические задачи.

5.4. Биорецепция адекватных воздействий.

Прием (лат. *гесертio*) сигналов живой системой включает, как правило, три этапа: первичное преобразование клеткой внешнего сигнального фактора в физиологически удобный физический или биохимический сигнал, трансляция его к месту обработки и распознавания и, наконец, распознавание и формирование физиологической ответной реакции. Последний этап относится к биоинформатике и биокибернетике и выходит за круг нашего раздела биофизики.

Ключевым элементом в биорецепторной системе является датчик внешнего (для клетки) воздействия. Как правило, клеточный приёмник (рецептор) находится в мембране клетки и представляет собой специальный молекулярный комплекс, способный с высокой избирательностью реагировать на воздействующие факторы. Можно назвать два исключения из этого правила. Высоко проникающие физические факторы воздействия могут находить свои мишени и внутри клетки.

Это электромагнитные поля и излучения (включая оптические), ионизирующая радиация, звуковые и ультразвуковые поля и излучения. Некоторые гормоны также могут, проникая в цитоплазму, оказывать воздействие непосредственно на мишени в ядре клетки. Внутри самой клетки также иногда существуют свои системы внутриклеточной коммуникации, но их рассматривают как составную часть внешних воздействий на клетку и не выделяют в отдельный класс. Источники воздействий, в свою очередь, разделяются на внутренние и внешние для организма. Первые (интерорецепторы) предназначены для приёма внутренних сигналов, вторые распознают факторы внешней среды. Если рецепторы первой группы имеют дело с ограниченным (хотя и большим) набором, как правило, химических носителей сигналов (типа медиаторов синаптической передачи, сигнальных пептидов и гормонов), то рецепторы внешних воздействий (экстерорецепторы) подвержены действию гораздо более разнообразных химических и физических факторов внешней среды. Поэтому эти две группы рецепторов различаются по устройству и механизмам действия. В процессе эволюции рецепторы внешних сигналов приспособились к распознаванию факторов, наиболее важных для жизнедеятельности организма и сформировали основу сенсорных систем организма, которые мы отождествляем с органами чувств. Действия внешних факторов на органы чувств, используемые организмом для анализа состояния окружающей среды и адекватной реакции на них, относят к адекватным воздействиям. Из-за исключительной важности для организма информации, которые несут адекватные воздействия, в процессе эволюции сформировались приспособительные механизмы, повышающие чувствительность и быстродействие адекватных реакций, в частности, появились специальные системы, увеличивающие вероятность контакта действующего фактора с клеточным рецептором. Этот дополнительный этап в анализе адекватных воздействий можно добавить к вышеперечисленным трём общим этапам приёма внешних сигналов. Действие же других факторов, которые не воспринимаются, как адекватные, но могут влиять на состояние физиологических систем, относят к неадекватным воздействиям. В данном разделе мы остановимся на принципах действия и общих характеристиках рецепторов адекватных воздействий.

5.4.1. Принципы организации клеточных рецепторов.

Как действуют внешние рецепторы? Как правило, внешний фактор X изменяет проницаемость сенсорной клетки для каких-либо главных

катионов, вследствие чего изменяется потенциал покоя клетки (см. формулу Гольдмана). Если проводимость калия падает, то потенциал растёт, если проводимость ионов калия возрастает, то потенциал падает. Для натрия всё наоборот. Если потенциал покоя клетки увеличивается (движется по направлению к порогу возбуждения потенциала действия), то такой процесс называется деполяризацией. Если потенциал падает, удаляясь от порогового значения, то этот процесс называется гиперполяризацией. Таким образом внешнее воздействие изменяет потенциал клетки по отношению к пороговому значению. Этот сдвиг потенциала называется рецепторным потенциалом. Наряду с рецепторным существует понятие генераторного потенциала. Генераторный потенциал – это возникающий или изменяющийся потенциал действия клетки. Если клетка, испытывающая внешнее воздействие, находилась в состоянии покоя, а рецепторный потенциал привёл её в возбуждение или клетка исходно была возбуждена, то частота генерации потенциала действия будет зависеть от величины превышения нового потенциала «псевдопокоя» от порогового потенциала. Возможен и другой вариант, когда рецепторная клетка была и остаётся в состоянии покоя, но её рецепторный потенциал через электрический или химический синапс может изменить частоту спонтанной импульсации соседней «генераторной» клетки. В обоих случаях сенсорная клетка является преобразователем интенсивности внешнего сигнала в изменение частоты следования нервных импульсов. В этом смысле сенсорная система аналогична модулятору частоты. Изменение проницаемости мембраны под действием внешнего для неё воздействия характерно и для некоторых интерорецепторов, например, для постсинаптических мембран в синапсах.

По типу внутриклеточных процессов, связывающих воздействие внешних факторов с изменением проницаемости мембраны рецепторные клетки разделяются на два класса: внешний сигнал непосредственно вызывает конформационный переход, в белке, формирующем ионный канал (рис. 5.4.1). Сюда относятся интерорецепторы постсинаптических мембран.

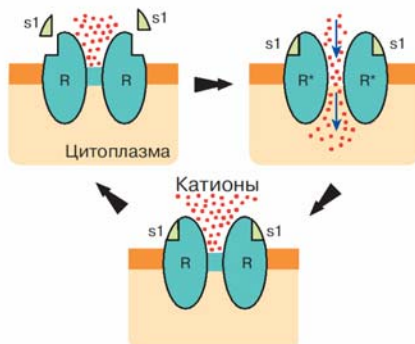


Рис. 5.4.1. Непосредственное управление проницаемостью мембраны. Здесь S – сигнал, R – рецепторный белок, R* - он же в конформационно напряжённом состоянии.

внешний сигнал вызывает цепь событий в мембране и цитоплазме, приводящей в итоге к изменению проницаемости (рис. 5.4.2). В этот широкий класс входят экстрасенсорные хеморецепторы вкуса и обоняния, а также зрительные фоторецепторы. По такой же схеме развиваются реакции интерорецепторных клеток в ответ на химические внутри организменные сигналы (гормоны, пептиды), но конечными продуктами их являются не изменения проницаемости мембран а химические соединения. Обязательным участником такого каскада реакций является так называемый G-белок. При конформационном превращении рецепторного белка $R \rightarrow R^*$ в G-белке происходит замена GDP на GTP. Это переводит белок в активное состояние, и одна из его субъединиц получает возможность включить следующую стадию каскада системной реакции. Возможность одной молекулы R^* активировать множество молекул G-белка, каждая из которых активирует множество молекул эффекторов, обеспечивает огромное усиление входящего сигнала. Самовыключение каскада через специфическое характерное для каждого типа рецептора время обеспечивается спонтанной диссоциацией комплекса SR и гидролизом $GTP \rightarrow GDP$ в G – белке, лишаящим его активности.

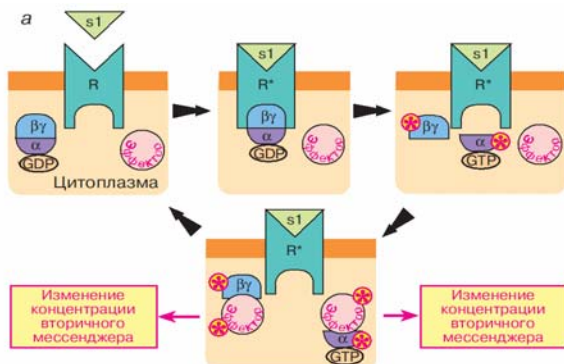


Рис. 5.4.2. Опосредованное управление проницаемостью мембраны. S – сигнальная молекула, R-рецепторный белок, R* - он же в напряжённом состоянии α , β , γ – субъединицы G – белка. GDP- гуанозиндифосфат. GTP – гуанозинтрифосфат. Эффектор – продукт, способный изменить проницаемость мембраны или активировать иные процессы в клетке.

По типу взаимодействия между собой клеток в составе рецептора выделяют три типа рецепторов:

Первично-чувствующие. При этом рецепторная клетка одновременно является и генератором импульсов. Рецепторный и генераторный потенциалы относятся к одной клетке. Такими являются термодатчики кожи, обонятельные клетки, некоторые механорецепторы.



Рис. 5.4.3. Первично-чувствующий рецептор.

Вторично-чувствующие. Здесь функции рецепции внешнего сигнала и генерации электрических импульсов разделены между двумя клетками. К этому типу относят вкусовые, зрительные, слуховые рецепторы.



Рис. 5.4.4. Вторично-чувствующий рецептор.

Третично-чувствующие. К этому типу иногда относят такую разновидность первично – чувствующих клеток, в которых имеется датчики, вынесенные на дендритах за пределы тела клетки и заключённые в специализированные капсулы (например, капсулы Мейснера, тельца Пачини) и аксоны, уносящие от неё нервные импульсы к другим участкам рецепторной системы.

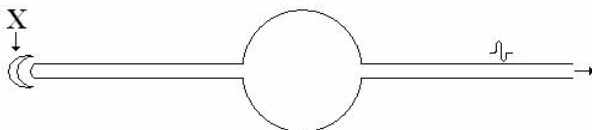


Рис. 5.4.5. Третично-чувствующие рецепторы.

Как и всякие преобразователи сигналов биосенсоры клетки имеют свои физические характеристики.

Частотная характеристика или инерционность. Эта характеристика относится к скорости реакции на изменения внешнего сигнала и сильно различается у разных рецепторов. Так, слуховые рецепторы способны воспринимать звуковые колебания до десятков килогерц, зрительные – электромагнитные колебания оптического диапазона. Однако, если говорить о скорости восприятия информации, переносимой этими колебаниями, то эта характеристика сопоставима со скоростью распознавания хемо-, термо- и механорецепторов и приблизительно оценивается временами порядка 0,1 – 1 сек.

Коэффициент усиления. Под этим термином зачастую понимают различные явления. Это может быть отношение энергии, содержащейся в рецепторном потенциале, к энергии входного сигнала, если её можно оценить физически разумным образом. А иногда под коэффициентом усиления подразумевают степень размножения сигнала, т. е. отношение количества частиц, появившихся в результате ответной реакции в рецепторной клетке к количеству квантов сигнала (молекул или фотонов) на её входе. Обычно это уточняется по контексту. Для обоих вариантов определения это –большие величины. Например, энергия рецепторного потенциала палочки глаза человека в десятки раз превышает энергию одного фотона, а количество молекул аденилатциклазы, активированных в клетке одной молекулой гормона, исчисляется сотнями, при том, что за время до их гидролиза каждая из них ус-

певает обеспечить синтез тысяч молекул, олицетворяющих биохимический ответ клетки на действие гормона.

Порог чувствительности. Он определяет, какое минимальное количество сигнального вещества (или энергии сигнала) необходимо для обнаружения сигнала. Здесь иногда необходимо отличать первичное воздействие сигнала на рецептор от воздействия, распознаваемого рецепторной системой как адекватный раздражитель. Так, например, палочка сетчатки глаза человека, откликается на один квант света, в то время, как восприятие вспышки света как реального явления требует одновременного возбуждения не менее 8–10 палочек. В первом случае речь идёт о «подпороговом» воздействии, которое не осознаётся мозгом, но объективно регистрируется рецепторной клеткой и, вероятно, в некоторых случаях может вызывать произвольные («интуитивные») реакции, лежащие в основе экстрасенсорного поведения некоторых индивидумов.

Чувствительность рецепторов может достигать фантастически высоких величин. Например, хеморецептор самца тутового шелкопряда имеет порог чувствительности к бомбиколу (веществу, выделяемому женской особью) равный $3 \cdot 10^{-19}$ г в 1 см^3 воздуха. Иначе говоря, эта бабочка способна почувствовать присутствие бомбикол в воздухе уже при концентрации 1000 молекул в см^3 , что соответствует расстоянию в несколько километров до особи противоположного пола.

Специализация. Это—способность рецептора адекватно реагировать на стимулы только определённой природы («модальности»), например, на вкус, но не на свет или на холод. У природных рецепторов специализация велика, но не беспредельна. Так, например, фоторецепторы зрительной системы, предназначенные для реакции на свет, могут генерировать ложный выходной сигнал на механическую стимуляцию (вспомним «искры из глаз» при резком сотрясении головы или ударе по главному яблоку). Именно это обстоятельство подчёркивает «закон Мюллера»: характер ощущения определяется не характером стимула, а раздражаемым сенсорным органом.

Селективность или избирательность. Это—способность отличить разные стимулы в пределах одного общего ряда. Например один запах от другого, один вкус от другого, одну частоту звука от другой . одно вещество от другого, или «настроенность» сенсорных клеток на запах, а не на звук. Селективность обеспечивается не отдельной клеткой, а всей сенсорной системой. Часто считают, что биорецепторы отличаются высокой селективностью. Для рецепторов внешних сигналов это не всегда так. Например, один химический стимул может возбудить сразу несколько рецепторных клеток в обонятельной выстилке (или

во вкусовом эпителии), а монохроматический звук вызывает отклик группы близко расположенных слуховых рецепторных клеток. Но паттерн возбуждения всего рецепторного поля весьма характерен для каждого стимула. И только его обработка в выше стоящих отделах нервной системы после некоторого периода обучения позволяет действительно тонко опознать сигнал и разделить его от близко похожих. Так, слуховая рецепция позволяет различать частоту чистых тонов с точностью до 2-3 Герц в диапазоне около 1 кГц. Такая высокая селективность внешних сигналов является результатом системных реакций. В отличие от рецепции внешних сигналов рецепторы внутренних сигналов не имеют системной обработки и высоко специфичны уже на первичном уровне. При этом управленческий сигнал воспринимается только теми клетками, для которых он предназначен; ошибки здесь нежелательны.

Динамическая кривая. Это—зависимость величины реакции от величины стимула. Такие кривые для клеток различной природы сильно различаются, и всё же было сделано много попыток описать их некоторыми общими математическими формулами. Отметим некоторые из них для иллюстрации. Первые успешные попытки были связаны с наблюдениями Э. Вебера, заметившего, что минимально различимое ощущение стимула пропорционально его исходному значению:

$$\Delta\phi = k \phi \quad \text{или} \quad \Delta\phi/\phi = k \quad (5.4.1)$$

где k —постоянная, характеризующая минимальную долю стимула, которую можно различить. Однако в дальнейшем выяснилось, что при малых величинах стимула значение коэффициента k возрастает. Возможно это связано с наличием спонтанной фоновой активности рецепторных клеток, которую нужно преувеличить, чтобы внешний стимул стал различим. Для учёта этого обстоятельства в формулу можно внести поправку в виде минимального порога различимого стимула ϕ_0 :

$$\Delta\phi = k (\phi + \phi_0) \quad (5.4.2)$$

Г. Фехнер, опираясь на формулу (5.4.1) для постоянства относительной чувствительности, получил интегральное выражение для связи психофизического ощущения со стимулом:

$$\psi = k \log (\phi/\phi_0) + \psi_0, \quad (5.4.3)$$

известное как формула Вебера-Фехнера. Именно этот логарифмический закон восприятия интенсивности внешнего стимула послужил основанием для введения единицы логарифмической шкалы интенсивностей – децибела:

$$A \text{ (дб)} = 10 \log (p_1/p_2) = 20 \log (a_1/a_2), \quad (5.4.4)$$

где p - мощность (или энергия), a - амплитуда внешнего воздействия. Для слухового анализатора, например, при средних частотах и интенсивностях звука минимальная различимость составляет примерно 1 дб.

Иногда используется «закон Геринга»:

$$\Psi = a \varphi / (1 + b\varphi) \quad (5.4.5)$$

Эта формула неплохо описывает, например изменение рецепторного потенциала фоторецептора (Ψ) от интенсивности светового потока (φ) для умеренных значений освещённости.

Обширные исследования количественной связи рецепторного сигнала с величиной стимула были проведены Стивенсом, который предложил общую эмпирическую формулу:

$$\Psi = k (\varphi - \varphi_0)^\alpha \quad (5.4.6)$$

Показатели степени α различны у рецепторов различной модальности. Так, для датчиков тепла α имеет значение 1,6; для датчиков холода – 1,0; для палочек сетчатки глаза 0,33; для ряда механорецепторов α лежит в диапазоне от 0,6 до 1,6; для рецепторов запаха оно близко к 0,5; для вкусовых рецепторов близко к 0,8.

Каждая из приведенных формул может удовлетворительно работать в некотором диапазоне стимулов и при подборе параметров в формуле, но логарифмическая зависимость отклика от интенсивности стимула более привлекательна. Логарифмический закон обеспечивает большой динамический диапазон монотонной связи сигнала со стимулом: в центральной части интенсивности стимула около $\varphi \approx \varphi_0$ в пределах 2-3 декад зависимость (2.5.3) выполняется достаточно точно, далее сохраняется лишь качественная тенденция. Хорошо зарекомендовала себя разновидность эмпирической формулы Геринга, выраженная как функция отклика от логарифма интенсивности стимула. С помощью тождественного преобразования из формулы (5.4.5) можно получить:

$$\Psi/\Psi_0 = \varphi / (\varphi_0 + \varphi) = (1/2) \operatorname{th}[(1/2) \ln \varphi - (1/2) \ln \varphi_0] + 1/2 \quad (5.4.7)$$

Эта S – образная зависимость представлена на рис. 5.4.6.

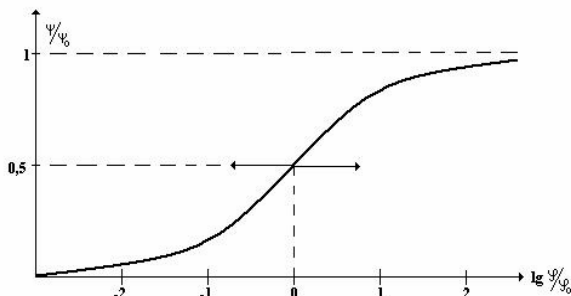


Рис. 5.4.6. Типичный вид амплитудной зависимости отклика рецепторной системы.

Такой вид зависимости обеспечивается различными физиологическими механизмами. В фоторецепторах насекомых это – процессы в самих рецепторных клетках, в палочках и колбочках сетчатки глаза позвоночных и в волосковых клетках кортиевого органа такая зависимость обусловлена комбинацией семейств клеточных рецепторов с разными наборами параметров φ_0 , но часто в этом принимают участие интегративные взаимодействия в высших отделах нервной системы. Эти же процессы обеспечивают явление адаптации, когда вся кривая чувствительности сдвигается по оси стимулов так, что через некоторое время её наиболее крутая часть подстраивается под средний уровень интенсивности стимула. Этим объясняется сочетание высокой разрешающей способности в отношении градации интенсивности стимула (контраст) при сохранении широкого динамического диапазона чувствительности

5.4.2. Хеморецепция.

Примером химических экстерорецепторов являются вкусовые и обонятельные рецепторы. Вкусовые рецепторы выстилают поверхность языка и близлежащей части глотки (рис. 5.4.7).

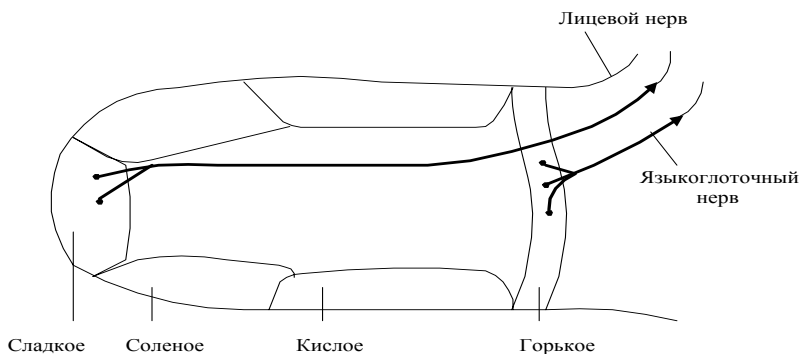


Рис. 5.4.7. Распределение вкусовых рецепторов по поверхности языка человека.

Вкусовые рецепторные клетки группируются в структуры (вкусовые почки), оптимально выполняющие свои функции (рис.5.4.8).

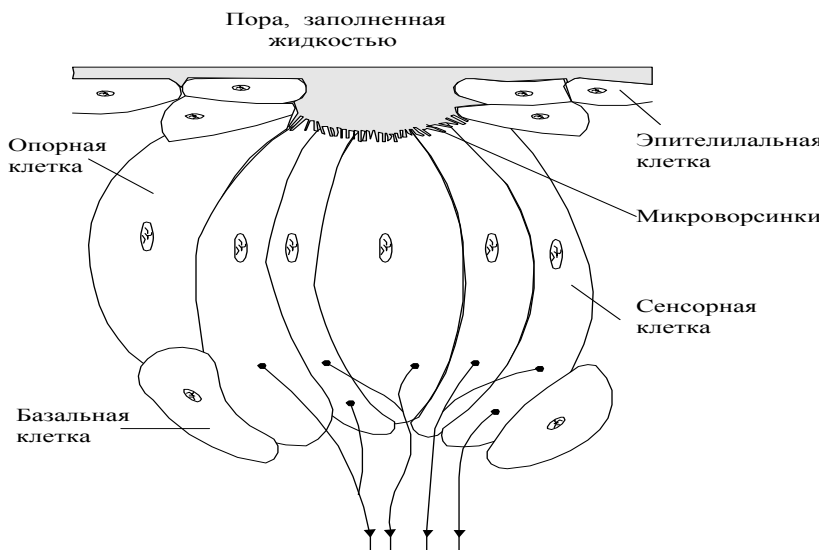


Рис. 5.4.8. Схема строения вкусовой почки.

Обладающие вкусом вещества растворяются в жидкости, омывающей микроворсинки, и диффундируют в рецепторные клетки, поверхность которых сильно изрезана для увеличения площади контакта. Физический механизм взаимодействия мембранных молекулярных рецепторов со вкусовым стимулом, распознающий его и изменяющий ионную проницаемость мембраны, изучен пока недостаточно глубоко.

Существует представление, что всё множество вкусовых ощущений формируется из нескольких фундаментальных независимых («ортогональных») вкусов: кислый, сладкий, горький и солёный. В последнее время их стали дополнять острым и жирным. Предполагается, что «вкус» вещества определяется только его химическим строением или пространственным расположением его компонентов. Так, сладким будет любое вещество X, обладающее специальной геометрией расположения атома кислорода и гидроксильной группы, горьким – вещество, содержащее элементы C и N (рис. 5.4.9). Кислым будет вещество, в состав которого входит большое количество легко диссоциирующих атомов водорода. Солёным будет казаться вещество, которое при растворении образует ионы Na^+ и Cl^- .

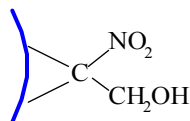
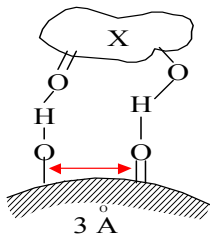


Рис. 5.4.9. Предположительная модель рецепторов сладкого (слева) и горького (справа).

Вкусовые рецепторы представляют собой пример полимодальности: ощущение вкуса можно имитировать, возбуждая область локализации рецепторов переменным током определённой частоты. Так, солёный стимул можно спровоцировать током с частотой 35 Гц, сладкий – с частотой 70 Гц, кислый – 75 Гц, горький – 100 Гц.

Модальность вкусовых рецепторов может подвергаться модификации. Так, белок из западно-африканского растения изменяет кислый вкус на сладкий, в результате чего лимон начинает восприниматься как апельсин. Нанесение на язык кокаина вызывает потерю всех четырёх компонент вкуса.

Пороги чувствительности вкусовых рецепторов значительно выше, чем обонятельных. У них другие условия работы и их функция очень слабо связана с поведенческой реакцией. Исключение составляет лишь рецепция горького вкуса, который часто присущ ядовитым соединениям. Видимо поэтому чувствительность этих рецепторов значительно выше других, а регистрация интенсивного горького стимула часто сопровождается рефлекторным рвотным движением. С возрастом, а также при частом употреблении кофе и табака, чувствительность вкусовых рецепторов значительно снижается.

Обонятельные рецепторы находятся в эпителиальной выстилке носа. Это также высокоорганизованные структуры (рис. 5.4.10).

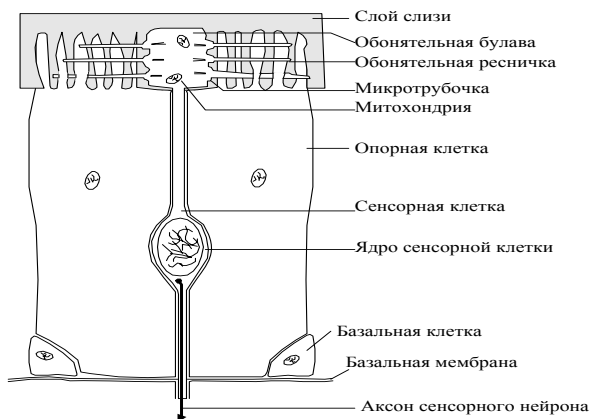


Рис. 5.4.10. Схема элементарной ячейки запаховых рецепторов в обонятельной выстилке.

Считается, что существует 7 фундаментальных запахов: камфарный, мускусный, цветочный, мятный, эфирный, едкий и гнилостный. Одно время доминировала гипотеза Эймура о молекулярной структуре «посадочных мест» в мембранных рецепторах и о взаимодействии молекулы пахучего вещества с рецептором по принципу «ключ – замок». Но она не получила достаточного экспериментального подтверждения, и по этому вопросу пока нет единого мнения. Несомненно лишь, что ощущение запаха является интегральным эффектом всего рецепторного поля, и его распознавание формируется в процессе обучения.

5.4.3. Фоторецепция.

С помощью глаз мы получаем до 90% информации об окружающем мире. Камерный глаз позвоночных способен различать свет, цвет, движение, способен оценивать скорость передвижения и осуществлять настройку («аккомодацию»). Пара глаз способна формировать объёмное представление об объекте и адекватно оценивать расстояние до него. Нейронная система глаза способна проводить большой объём первичной обработки зрительного сигнала и самостоятельно без помощи высших отделов мозга решать важные оперативные задачи. Поэтому сетчатку глаза иногда называют частью мозга, вынесенную к фоторецепторам. Это является следствием длительной эволюции зрительной системы. Глаза насекомых, пауков и ракообразных устроены более примитивно, хотя и они успешно решают свои более простые задачи (рис. 5.4.11).

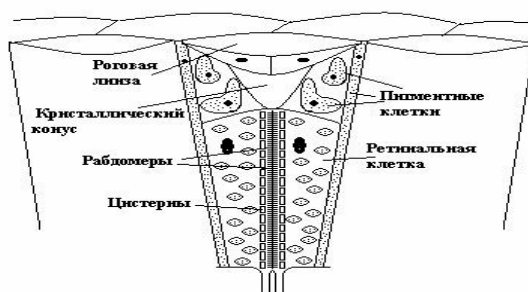


Рис. 5.4.11 Сложный «фасетчатый» глаз насекомого.

Такой глаз представляет собой совокупность отдельных фотоприёмников («омматидиев»), образующих своими входными отверстиями сферическую поверхность. Каждый из омматидиев собирает свет со своего участка апертуры сложного глаза. Диоптрический аппарат омматидия включает маленькую роговичную выпуклую линзу и примыкающую к ней коническую линзу. Свет, собранный этим аппаратом, попадает во внутреннюю аксиальную часть омматидия («рабдомер»). Коэффициент преломления материала рабдомера выше, чем у окружающей цитоплазмы, и он ведёт себя как волоконный световод. Параметры световода таковы, что луч света, попадающий в омматидий под углом к его оси не более 6° , испытывает полное внутреннее отражение от стенок и достигает фоторецепторных клеток. Остальные лучи проникают в стенки световода и поглощаются пигментами, разделяющими разные омматидии. У некоторых насекомых рабдомеры могут изгибаться, не теряя своих волноводных качеств. В отличие от глаза позвоночных, в фасетке не строится геометрическое изображение предмета, и образ объекта синтезируется из распределения освещённости по ансамблю омматидиев.

Разрешающая способность в определении градации яркости или освещённости объекта зависит от угла между оптическими осями соседних омматидий. Казалось бы, чем больше омматидий размещается в объёме глаза, тем выше разрешающая способность фасетчатого глаза. Однако при заданном объёме глаза с ростом числа омматидий неизбежно снижается размер входной апертуры каждой из них, и появляется дифракционное снижение точности определения направления. Поэтому для каждого размера глаза должно существовать компромиссное число омматидий. Сделаем необходимую оценку. Пусть радиус фасетки R , а диаметр входной линзы омматидия D . Тогда угол между осями соседних омматидиев $\Delta\varphi = D/R$. Дифракционный предел углового разрешения даётся формулой Рэлея:

$$\Delta\varphi = 1,22\lambda/D \quad (5.4.8)$$

Оптимум соответствует равенству этих двух составляющих углового разрешения. Это даёт:

$$D_{\text{опт}} = (1,22R\lambda)^{1/2} \quad (5.4.9)$$

$$\Delta\varphi_{\text{опт}} = (1,22\lambda/R)^{1/2} \quad (5.4.10)$$

Для пчелы $R = 1,5$ мм, средняя длина волны видимого света $\lambda = 500$ нм. Подстановка этих значений в формулу (5.4.9) даёт: $D = 30$ мкм. и $\Delta\varphi_{\text{опт}} = 2$

10^{-2} рад. $\approx 1^\circ$. Фактический диаметр входной линзы омматидия у пчелы 32 мкм, т. е. действительно является оптимальным. Радиус фасетки лимитируется габаритом головы насекомого. Глаз рабочего муравья содержит около 100 омматидий, глаз стрекозы – 28000. Поскольку число омматидий, уместяющихся в фасетке, $N \sim R/D$, а при оптимальных условиях D и R связаны соотношением (5.4.9), то острота зрения этих насекомых должна различаться в корень квадратный из отношения линейных размеров их глаз, т. е. приблизительно в 20 раз. В явном же виде при заданном R , как это видно из формулы (5.4.10), острота зрения от числа фасеток не зависит.

Следует отметить, что поле зрения отдельной фасетки, как указывалось выше, составляет около 12° , т. е. существенно превышает угол между осями соседних омматидиев (см. формулу 5.4.9). Это означает, что поля зрения омматидиев значительно перекрываются, и в распознавании вида объекта и параметров его движения существенное значение принадлежит нейронной обработке сигналов от системы фоторецепторов. Вероятно, используемое для этого латеральное торможение сигналов от соседних зон, позволяет существенно обострить восприятие градации освещенности и довести реальную остроту зрения насекомых до 5–10 угловых минут, при указанном выше пределе индивидуальной остроты разрешения индивидуальных омматидий около 1 градуса.

Габариты тела крупных животных, включая человека, позволяют разместить в голове более крупные органы зрения, имеющих более сложное строение. Схема строения глаза крупных животных (и человека) приведена на рис. 5.4.12.

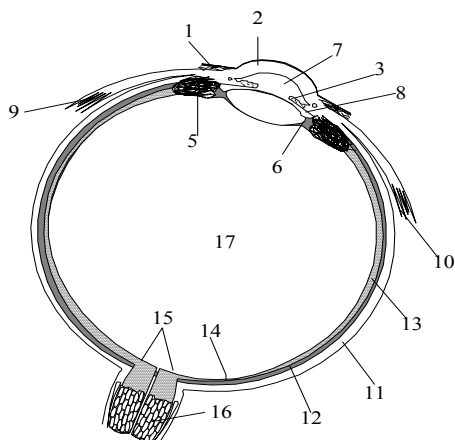


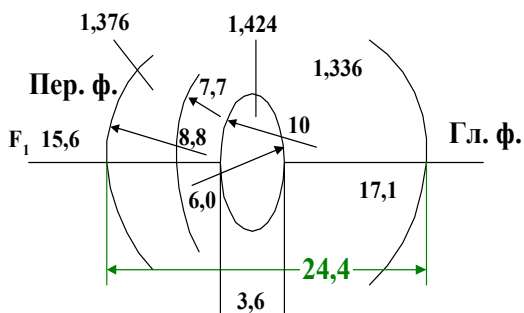
Рис.5.4.12. Разрез глазного яблока (схема).

1 – конъюнктива; 2 – роговица; 3 – радужка; 4 – хрусталик; 5 – ресничное тело; 6 – связка, при помощи которой хрусталик прикрепляется к ресничному телу (ресничный пояс); 7 – передняя камера глаза; 8 – задняя камера глаза; 9, 10 – мышцы глазного яблока; 11 – склера; 12 – сосудистая оболочка; 13 – сетчатка; 14 – центральная ямка; 15 – решетчатая пластинка; 16 – зрительный нерв; 17 – стекловидное тело.

Основной объём глазного яблока занимает стекловидное тело, отделяющее диоптрическую часть глаза от сетчатки, где сосредоточены фоторецепторы. На поверхности сетчатки как на экране формируется оптическое изображение объекта, информация о котором (о его контурах, цвете и градации освещённости в его пределах) кодируется рецепторными потенциалами палочек и колбочек сетчатки, затем перекодируется в импульсную активность близлежащих нейронов и передаётся для распознавания в высшие отделы мозга. Колбочки отвечают за восприятие цвета, палочки воспринимают только интенсивность освещения, но имеют более высокую чувствительность. Максимальная концентрация светочувствительных клеток находится в ямке, там, где оптическая ось глазного яблока пересекает дно глаза, на котором расположена сетчатка. В ямке концентрация колбочек значительно превосходит концентрацию палочек. На периферии сетчатки фоторецепторы расположены значительно реже, и там практически нет колбочек, а периферические палочки обладают большим быстроедействием и хорошо распознают объекты, движущиеся

сзади и сбоку, представляющие потенциальную опасность и требующие быстрой реакции. Радужная оболочка играет роль диафрагмы, регулируя количество света, проникающего в глаз. Она очень сильно иннервирована, причем на ней присутствуют клетки, генетически связанные с различными органами. На радужку вынесен как бы «портрет» организма, и это используется в особой «иридодиагностике» заболеваний человека.

Существует несколько заблуждений относительно функционирования глаза. Первое из них состоит в том, что основная оптическая сила глаза якобы формируется хрусталиком. Это не так. На рис. 5.4.13 изображены оптические характеристика элементов глаза. Основная оптическая сила формируется поверхностью, разделяющей воздух с коэффициентом преломления $n = 1$, и роговицы со значительно большим значением n . Роговица имеет две поверхности с разными радиусами кривизны. Перепад коэффициентов преломления на границе хрусталика со стекловидным телом гораздо меньше. Оптическая сила глаза составляет примерно 70 диоптрий, из них на долю хрусталика приходится в молодые годы 14 диоптрий, а в 70 лет - всего 1 диоптрия! С возрастом хрусталик теряет свою упругость, и растягивающие его цилиарные мышцы делают его почти совсем плоским. Основная функция хрусталика состоит в доводке фокусировки изображения на сетчатке и с возрастом обычно возникающую дальнюю зоркость приходится компенсировать дополнительной «положительной» линзой в очках.



$n = 1,333$

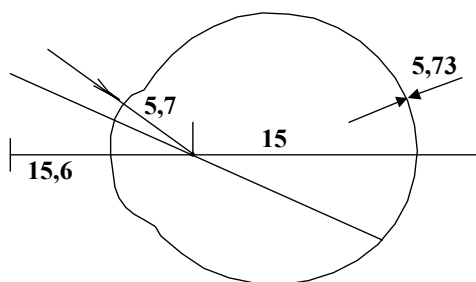


Рис. 5.4.13. Слева – оптические параметры глаза: коэффициенты преломления, размеры и радиусы кривизны (в мм). Справа – приведённый глаз из однородного материала, имеющий ту же оптическую силу, что и реальный глаз.

Второе заблуждение состоит в предположении, что оптические свойства глаза можно описать моделью тонкой линзы. На самом же деле изображение формируется внутри самой преломляющей системы. Поэтому для расчёта изображения следует пользоваться более общими формулами, следующими из хода лучей, представленным на рис. 5.4.14.

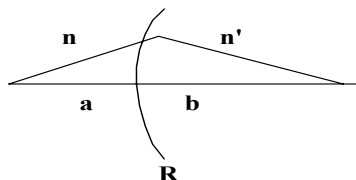


Рис. 5.4.14. Схема хода лучей через границу раздела сред.

$$\frac{n}{a} + \frac{n'}{b} = \frac{n' - n}{R} = \frac{n'}{f'} = \frac{n}{f} \quad (5.4.11)$$

Здесь f' и f – задний и передний фокус, соответственно.

Третье заблуждение состоит в представлении, что глаз, фиксируя изображение неподвижного предмета, сам остаётся неподвижным. Это не так. Электрический потенциал фоторецептора, вызванный светом, быстро релаксирует, и образ неподвижного изображения на сетчатке исчезает за доли секунды. Чтобы сохранить образ статического предмета, глаз производит периодическое сканирование своей оптической оси вокруг направления на предмет: дрейф на 2-10 угловых минут за секунду, затем резкий скачок обратно со скоростью несколько градусов в секунду и т. д.

У сетчатки выделяют 2 слоя: верхний и глубинный. И с этим связано ещё одно заблуждение. Иногда полагают, что свет, формирующий изображение, сразу попадает на слой фоторецепторов. Однако верхний, первый по ходу лучей слой составляют кровеносные сосуды и нервные клетки, а глубинный – светочувствительные клетки и пигментные клетки. Таким образом, прежде чем свет попадет на светочувствительные клетки, он проходит инертные, рассеивающие ткани, в которых теряется около половины попадающего в зрачок света. Физиологический смысл этого парадоксального обстоятельства пока не ясен. Роль пигментных клеток, наполненных меланином (их иногда называют «черным эпителием»), также остается невыясненной. Раньше думали, что пигментный эпителий нужен только для того, чтобы поглощать «лишний» свет, который отражаясь от дна сетчатки, мог бы вызвать размытость изображения. Однако роль чёрного эпителия, вероятно, не ограничивается этим. С ростом освещённости этот эпителий изменяет форму и площадь контакта с фоторецепторами. При этом в самом эпителии возникают свободные радикалы и подвижные носители заряда. Эти процессы похожи на процессы, наблюдаемые в антеннах и реакционных центрах фотосинтетического аппарата. Можно предположить, что здесь идёт какой-то процесс, способствующий обеспечению фоторецепторных клеток энергией, так необходимой им при высоких уровнях светового потока. У животных, ведущих ночной образ жизни (например, у кошек), такой проблемы нет. Эпителиальный слой, наоборот, играет роль отражающего экрана, помогая дополнительно собрать фотоны, не поглощённые фоторецепторами, и увеличить чувствительность глаза. Этим объясняется то, что у кошек в темноте глаза иногда «светятся».

Острота зрения, т. е. угловое разрешение элементов объекта, определяется плотностью расположения фоторецепторных клеток на сетчатке и входной апертурой диоптрического аппарата глаза. Как и у фасеточного глаза насекомых в камерном глазе животных этот вопрос решается оптимальным сочетанием плотности рецепторов и диаметра зрачка. Действительно, дифракционное размытие по Релею:

$$\Theta = 1,22 \frac{\lambda}{d \cdot n} = 1,2 \frac{0,6 \cdot 10^{-3}}{3 \cdot n} \approx 2 \cdot 10^{-4} \text{ рад.} \quad (5.4.12)$$

При заднем фокусном расстоянии глаза человека 15 мм это даёт для линейного размера размытия изображения на сетчатке $\Delta l = 15 \cdot 2 \cdot 10^{-4} \text{ мм} = 3 \text{ мкм}$, что хорошо согласуется с поперечным габаритом плотно упакованных фоторецепторов.

Светочувствительные клетки глаза бывают двух видов: колбочки и палочки. Палочек, отвечающих за чёрно-белое зрение, примерно 120 млн., колбочек, обеспечивающих цветное зрение, – 6 млн. Плотность колбочек максимальна в середине центральной ямки, а палочек – вокруг этой ямки; в ней самой они полностью отсутствуют. Оба типа рецепторов сходны по структуре в том смысле, что и у тех, и у других есть наружный сегмент, состоящий примерно из тысячи мембранных дисков (палочки) и мембранных складок (колбочки). Он соединяется с остальной частью клетки узкой «ресничкой» (рис. 5.4.15).

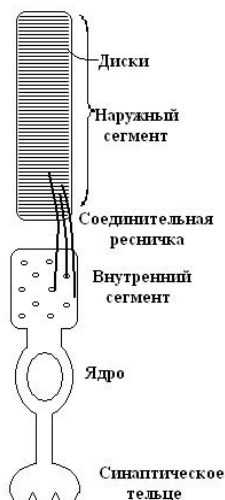


Рис. 5.4.15. Схема строения палочки.

В живом глазе диски фоторецепторов непрерывно обновляются. Время жизни дисков равно приблизительно 10 дней.

Фоторецепторы сетчатки позвоночных представляют собой вторично-чувствующие рецепторы. Свет, поглощаемый палочками и колбочками вызывает появление на их внешних мембранах рецепторного потенциала – представляющего собой изменение потенциала покоя клетки (рис. 5.4.16).

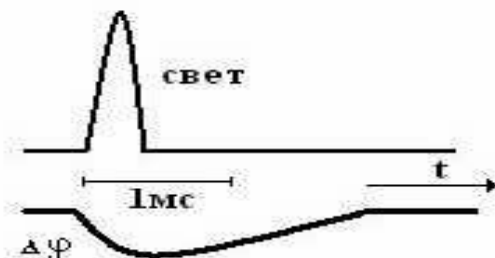


Рис.. 5.4.16. Типичный рецепторный сигнал палочки.

Далее этот потенциал управляет импульсной активностью близлежащих нейронов. По мере удаления от слоя палочек вглубь нейронной сети (рис. 5.4.17) суммарный электрический сигнал с нейронного участка сетчатки («ретины») всё более становится импульсным и вклад в него аналогового сигнала от палочек и колбочек уменьшается.

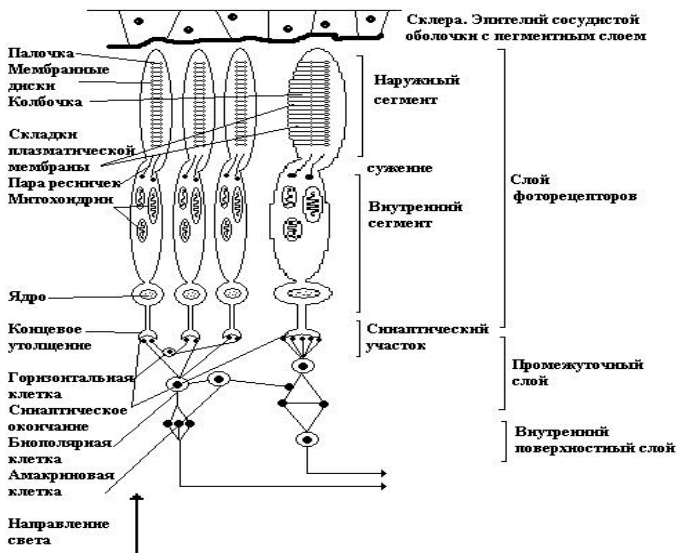


Рис.5.4.17.Схема пространственной организации сетчатки: слоя фоторецепторов и слоёв нейронов, формирующих сигналы для последующей обработки изображений.

Нейроны сложным образом суммируют сигналы от различных фоторецепторов. При этом с помощью «горизонтальных клеток» осуществляется взаимное торможение активности соседних нейронов. Это «латеральное» торможение осуществляется так, что более освещённые рецепторы сильнее подавляют соседние менее освещённые, чем сами испытывают торможение от менее освещённых. Это формирует такой горизонтальный профиль возбуждения глубинного слоя нейронов, в котором особенно подчёркиваются контуры участков изображения объекта с переменной освещённостью. На рис. 5.4.18 приведен пример такого контрастирования границ освещённого участка на сетчатке в одномерном изображении.

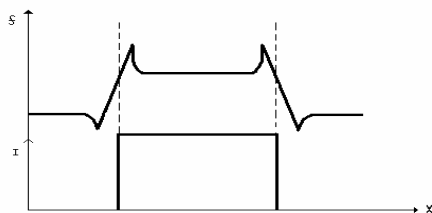


Рис. 5.4.18. Зависимость освещённости изображения сетчатка от пространственной координаты (внизу) и зависимость частоты импульсной активности нейронов, от соответствующей пространственной координаты.

Такой приём увеличения пространственной разрешающей способности анализатора внешнего воздействия широко используется в рецепторных системах.

Наряду с представлением о физических характеристиках глаза как фотоприёмника, большое значение для биофизики зрения имеет представление о механизме преобразования светового стимула в рецепторный потенциал, представляющий собой электрический сигнал на мембране палочки или колбочки. Между поглощением света рецепторной клеткой и изменением электрического потенциала мембраны лежит целый каскад элементарных событий, приводящий к преобразованию природы сигнала и увеличению его энергии.

Свет поглощается в стенках дисков, заполняющих наружный сегмент рецепторной клетки. Основным материалом стенок дисков – мембранный белок родопсин у палочек (иодопсин у колбочек), семикратно пронизывающий мембрану диска. Родопсин это комплекс собственно бесцветного белка опсина (максимум оптического поглощения на длине волны 278 нм) и пигмента ретиналя (максимум поглощения ~ 375 нм).

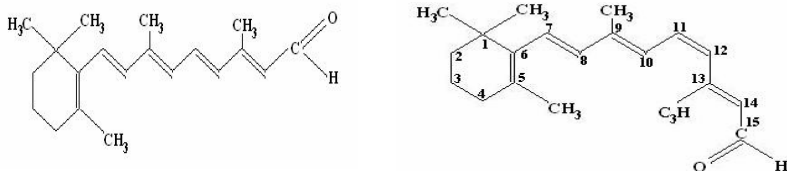
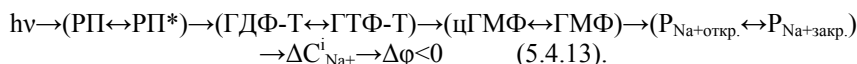


Рис. 5.4.19. 11-цис ретиналь (слева) и полностью транс-ретиналь (справа).

Родопсин поглощает в жёлто-зелёной области (максимум - 550 нм) и придаёт сетчатке розовую окраску. Ретиналь является производным от ретинола (витамина А) и имеет две конформации: 11-цис и полностью транс (рис 5.4.19).

В темноте родопсин (РП) содержит цис-форму пигмента. Оптическое возбуждение родопсина (РП*) сопровождается цис-транс переходом ретиналя, его химическая связь с опсином нарушается, и белок обесцвечивается. В результате такой фотоизомеризации одна из петель белка приобретает ферментативные свойства для реакции превращения внутриклеточного фермента ГДФ-Трансдуцина в ГТФ-Трансдуцин. Последний комплекс способен активировать присутствующую в цитоплазме цГМФ-фосфодиэстеразу. Этот фермент в своей активной форме гидролизует циклическую форму ГМФ, переводя ГМФ в нециклическую неактивную форму. Известный вторичный мессенджер цГМФ поддерживает натриевые (и кальциевые) каналы наружной мембраны клетки в открытом состоянии, обеспечивая пассивный приток этих катионов в цитоплазму. Калий-натриевые насосы клетки выкачивают ионы натрия наружу, поддерживая некоторую стационарную величину потенциала покоя клетки (около – 30 мВ у палочек человека). Гидролиз цГМФ уменьшает число открытых каналов, а вместе с этим и приток положительных ионов в цитоплазму. В результате потенциал покоя клетки смещается к более отрицательному значению. Эта фотоиндуцированная гиперполяризация и является рецепторным потенциалом, показанным на рис. 5.4.16. Вся цепочку процессов можно изобразить следующим образом:



Здесь P_{Na+} – проницаемость цитоплазматической мембраны для ионов натрия, C_{Na+}^i – концентрация ионов натрия в клетке, φ – стационарное значение потенциала покоя клетки, остальные обозначения определены в тексте. Все активные формы участников описанного каскада имеют свои характерные времена жизни, по истечении их исходное состояние восстанавливается. Продолжительность действия всего каскада, вызванного одним квантом света порядка 1 мсек. За это время гидролизуются порядка 100 молекул цГМФ и, соответственно, закрывается столько же калиевых каналов. Так возникает многократное усиление сигнала. Зная величину сдвига φ (а это около 1 мВ), можно оценить изменение числа ионов натрия в клетке, вызванное одним поглощённым фотоном. Действительно, изменение заряда клетки связано с $\Delta \varphi$ и ёмкостью мембраны палочки (C) известным соотношением: $\Delta Q = \Delta Na+ \cdot q = C \Delta \varphi$, (здесь q – эле-

ментарный заряд). Считая палочку круглым цилиндром с радиусом 1 мкм и длиной 40 мкм. и принимая для мембраны толщину 7 нм и диэлектрическую постоянную равную 3 легко получить для ΔNa^+ :

$$\Delta Na^+ = C \Delta \phi / q = 6 \cdot 10^3 \quad (5.4.14).$$

Можно оценить и энергию этого электрического сигнала, как работу (W), необходимую для изменения потенциала на конденсаторе от значения ϕ до значения $\phi + \Delta \phi$. Так как в нашем случае $\Delta \phi$ (1мВ) $\ll \phi$ (30 мВ), то расчёт прост:

$$W = Q \Delta \phi = (\Delta Na^+ q) \phi = \Delta Na^+ (q \phi) 6 \cdot 10^3 \cdot 30 \cdot 10^{-3} = 180 \text{ эВ}. \quad (5.4.15).$$

Отнесение этой энергии к энергии кванта жёлтого света, равную 2.2 эВ даёт $W / h\nu = 82$. В данном случае «энергия электрического сигнала» на выходе рецепторной системы это уменьшение электростатической энергии мембраны клетки. Этот процесс уменьшения заряда клетки, как и все химические этапы предшествующего каскада, – релаксационный процесс, спровоцированный квантом света. Энергия кванта пошла лишь на возбуждение электронной системы родопсина, ставшего катализатором дальнейших самопроизвольных химических процессов, субстраты которых исходно были в термодинамически неравновесном состоянии и только ждали своих катализаторов, чтоб релаксировать в равновесное состояние. Разумеется, энергия, обеспечившая «усиление» сигнала – это энергия метаболизма, накачанная в систему в темновой стадии, до прихода фотона и в промежутках между ними, когда они следуют потоком. С ростом частоты следования, когда отдельные рецепторные потенциалы клетки от последовательности фотонов начинают перекрываться, амплитуда суммарного импульсного ответа клетки увеличивается, но потом с уровня около 5 мВ начинает насыщаться. С этого момента мощность метаболизма клетки начинает лимитировать скорость восстановления энергии участников каскада. Самым медленным процессом восстановления является ресинтез родопсина после его фотодиссоциации и выпетания. При значительных уровнях освещения, когда значительная часть родопсина палочки оказывается обесцвеченной, требуемый период темновой адаптации значительно возрастает и достигает минут и десятков минут.

Большой коэффициент усиления сигнала в палочке обеспечивает ей высокую квантовую чувствительность: одна палочка может генерировать физически измеримый сигнал от одного фотона. Но это порождает проблему высокой вероятности появления ложных сигналов, например, из-за тепловых флуктуаций состояния участников каскада в его начальном уча-

стке. Чтобы защитить мозг от фона этих шумовых ложных «мерцаний» в системе предварительной обработки сигналов в нейронной системе реализована так называемая «схема совпадений», применяемая в некоторых технических устройствах для решения подобной задачи. Она устроена так, что сигнал фиксируется если на «сумматор» поступает одновременно N или более импульсов от отдельных приёмников. В частности у человека в среднем $N = 8$, но у разных людей эти пороги могут несколько различаться. При меньшей интенсивности возбуждения источник сигнала может не фиксироваться в сознании, но объективно он регистрируется отдельными рецепторами. Роль и судьба таких «подпороговых» сигналов не изучена. Возможно, эти сигналы лежат в основе некоторых экстрасенсорных явлений в биорецепции.

Биохимические процессы в колбочках сходны с процессами в палочках. Существенное отличие заключается в том, что фоточувствительным пигментом в них является не родопсин, а иодопсин трёх разновидностей, разделяющий колбочки на 3 типа с разной спектральной чувствительностью. Физические параметры этих рецепторов изучены меньше, чем палочек. У золотых рыбок максимумы поглощения трёх типов колбочек характеризуются длинами волн 455, 530 и 625 нм, у человека 450, 580 и 450 с 625 нм, соответственно. Предполагается, что цвет объекта анализируется мозгом по весовым вкладам рецепторных сигналов от трёх типов колбочек. Опыты показывают, однако, что для правильного восприятия цвета объекта глазу необходима информация о спектре источника освещения объекта. Вероятно, механизм распознавания цвета более сложен.

5.4.4. Слуховая рецепция.

Рецепция акустических колебаний среды является специальным видом механорецепции. Существует множество типов механорецепторов. Среди них важное место занимают интерорецепторы состояния и движения собственных тканей и органов животного, без которых невозможна правильная организация движений и мониторинг состояния систем организма. Сюда относятся, например, элементы мышечного веретена, контролирующие растяжение мышцы, тельца Гольджи, следящие за растяжением сухожилий, Мейснеровы тельца в кожных сосудах, некоторые датчики из семейства телец Пачини, которые контролируют положение суставов. Из экстерорецепторов следует назвать Меркаловы диски, выполняющие роль тактильных рецепторов в коже, придающие особую чувствительность губам, а также тельца Пачини, регистрирующие давление и вибрацию. О физических механизмах их функционирования известно немного. В основе некоторых из них могут лежать процессы, сводящие их первичные ак-

ты к механизмам хемо- или электрорецепции. Мы не будем их здесь обсуждать, а остановимся более подробно на устройстве слухового аппарата человека и механизме его работы, в силу его важности и полезности как примера организации рецепторной системы.

Прежде всего следует напомнить, что диапазон частот колебаний воздушной среды, которые способны воспринимать слуховой аппарат человека, простирается от 16 Гц. до 20 кГц. С возрастом диапазон значительно сужается, особенно со стороны высоких частот. Для сравнения можно привести верхние частоты, воспринимаемые домашними животными: у собаки – 38 кГц, у кошки – 70 кГц.

Рабочий частотный диапазон слухового аппарата человека охватывает частоты колебаний, производимые бытовыми, музыкальными, техническими и природными источниками: гром 40 Гц, орган – $16 \div 8000$, скрипка – $200 \div 13000$, мужская речь – $100 \div 8000$, женская речь – $800 \div 10000$, писк комара – $12000 \div 16000$ Гц.

Интенсивность звуковых колебаний можно измерять в амплитуде звукового давления или в плотности потока мощности звукового давления. Порог слышимости соответствует $2 \cdot 10^{-5}$ Па, болевой порог – $2 \cdot 10^2$ Па, повреждение барабанной перепонки – $2 \cdot 10^3$ Па, или около $3 \cdot 10^{-2}$ нормального атмосферного давления. Плотность потока звуковой мощности на пороге слышимости составляет 10^{-16} Вт/см², а уровень разрушения барабанной перепонки – 1 Вт/см². Однако в акустике принято выражать интенсивность звука в относительных единицах и выражать её в децибелах (см. формулу (5.4.4)). За уровень сравнения (0 дБ.) принят порог слышимости. По этой шкале болевой порог соответствует 140 дБ. Рабочий динамический диапазон уха в 140 дБ. поражает воображение своей широтой, но особенно восхищает низкий уровень порога слышимости. Пересчитаем его в более наглядные величины. Амплитуда давления P_0 , оказываемое звуковой волной на виртуальную поперечную площадку, связанная с амплитудой скорости колебательного движения молекул воздуха v_0 , плотностью воздуха ρ и скоростью звука известным соотношением:

$$P_0 = v_0 \rho c \quad (5.4.16)$$

Амплитуда гармонических колебательных смещений молекул воздуха A_0 связана с амплитудой скорости колебаний очевидным образом: $A_0 = v_0/\omega$, где ω – угловая частота звуковых колебаний. Подставив это соотношение и выражение (5.4.16), получим для A_0 :

$$A_0 = P_0/\omega \rho c \quad (5.4.17).$$

Расчёт для частоты 1 кГц, для которой приведено выше значение порога слышимости, и подстановка для плотности воздуха 1 кг/м^3 и скорости звука 340 м/с. даёт $A_0 = 0,1 \text{ А}^0$. Это меньше размера атома водорода! Такая высокая чувствительность объясняет интерес к биофизическому механизму этой рецепции.

Слуховой аппарат это парный орган. Два приёмника по разности фаз входящих на них колебаний, позволяют определять направление на источник звука (бинауральный эффект). Каждое ухо в свою очередь содержит три структурно и функционально различающиеся части (рис. 5.4.19).

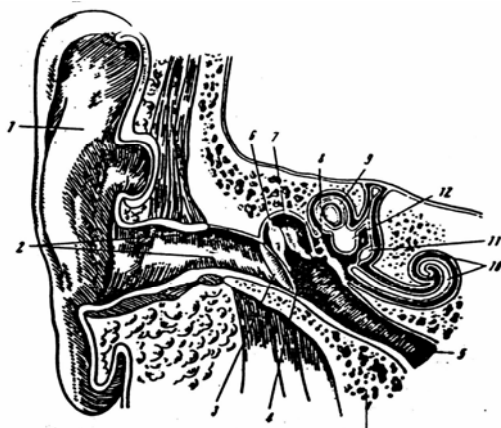


Рис. 5.4.19. схема строения уха человека. 1-ушная раковина, 2- наружный слуховой проход, 3-барабанная перепонка, 4-полость среднего уха, 5-слуховая труба, 6-молоточек, 7-наковальня, 8-стремячко, 9- полукружный канал, 10-улитка, 11-мешочек, 12-маточка.

Ушная раковина и наружный слуховой проход с барабанной перепонкой образуют «наружное ухо». Полость среднего уха с косточками (молоточек, наковальня и стремячко) и слуховой трубой составляют «среднее ухо». Улитка с находящейся в ней мембранной системой и механорецепторами формирует «внутреннее ухо». Полукружный канал и прилегающие к нему мешочек и маточка относятся к вестибулярному аппарату и органу равновесия.

Наружное ухо представляет собой в сущности «резонатор Гельмгольца», т. е. трубу, открытую с одного конца и замкнутую барабанной перепонкой с другого. Наружная раковина у человека является рудиментарным органом, но у некоторых животных служит концентрирующим ру-

пором, направляемым на источник звука. В резонансной трубе устанавливаются стоячие акустические волны с пучностью смещения частиц воздуха на открытом конце и пучностью давления на барабанной перепонке. Резонанс приходится на частоту, на которой на длине трубы укладывается четверть длины звуковой волны. На этой частоте поверхность барабанной перепонки испытывает наибольшее давление. Частотная характеристика передачи давления на барабанную перепонку «наружным ухом» приведена на рис. 5.4.20.

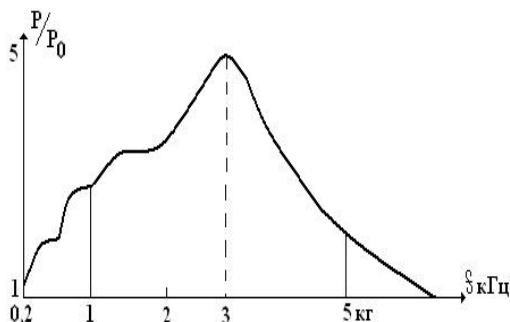


Рис. 5.4.20. Частотная характеристика наружного уха.

Максимум давления приходится на частоту около 3 кГц. (длина волны равна 10,8 см). Четверть длины волны при этом точно укладывается на длине наружного прохода (2,7 см у человека). Добротность этой колебательной системы примерно 2. Увеличение давления в максимуме по отношению к 200Гц составляет 5 раз (14 дБ). Функция наружного уха исчерпывается передачей звукового давления от внешней среды на барабанную перепонку. Неравномерность частотной характеристики вносит свой вклад в подчёркивание средних частот в общей характеристики уха.

Барабанная перепонка является входом в замкнутую акустическую систему «среднего уха». Эта часть слухового аппарата выполняет несколько функций. Первая, главная – передача звукового давления на вход внутреннего уха. Эта функция реализуется с помощью миниатюрных косточек (молоточек, наковальня и стремячко), образующих систему рычагов с коэффициентом передачи силы $K_f = 1,3$. Первое плечо рычага, молоточек, прикреплен к барабанной перепонке, площадь их контакта $0,55 \text{ мм}^2$. Последнее плечо, стремячко, упирается в овальное окно, являющееся входом во внутреннее ухо. Площадь их контакта $0,032 \text{ мм}^2$. Разница в пло-

сдвиге фазы приводит к дополнительному изменению давления. С учётом этого обстоятельства коэффициент усиления давления K_p значительно превосходит K_f :

$$K_p = K_f 0,55/0,032 = 22 \text{ (25 дБ)} \quad (5.4.18)$$

Такое устройство передачи давления представляет из себя в сущности согласующий трансформатор. Действительно, воздушная среда снаружи имеет низкое волновое сопротивление для акустических колебаний звукового диапазона Z_0 , равное отношению $P_0/v_0 = 43 \text{ г/см}^2 \text{ с}$. Среда внутри внутреннего уха это жидкость, лимфа, с высоким волновым сопротивлением $Z = 1,5 \cdot 10^5 \text{ г/см}^2 \text{ с}$. При непосредственном переходе звуковой волны из воздушной среды в жидкую должно возникать сильное отражение. Коэффициент отражения

$$\Gamma = (Z - Z_0)/(Z + Z_0) \approx 1 \quad (5.4.19)$$

Система косточек, превращая большую амплитуду колебания барабанной перепонки от воздушной среды с низким давлением в малую амплитуду колебаний овального окна, контактирующего с лимфой при большом давлении, согласует волновые сопротивления двух сред и уменьшает коэффициент отражения звука. В этом состоит вторая функция среднего уха. Из-за инерционности элементов рычага, упругости элементов его крепления к стенкам и резонансных свойств самой полости внутреннего уха, коэффициент трансформации, а, значит, и коэффициент отражения зависят от частоты. На рис. 5.4.21 показан на комплексной плоскости годограф зависимости входного импеданса среднего уха от частоты.

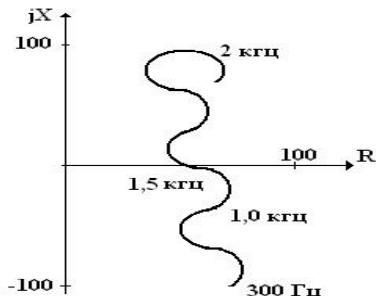


Рис. 5.4.21. Частотная зависимость комплексного коэффициента отражения звуковой волны от барабанной перепонки уха. Модуль коэффициента – длина линии, соединяющей начало координат с точкой на кривой.

Минимальное значение коэффициента отражения приходится на средние частоты 1-1,5 кГц, где мнимая часть входного импеданса проходит через ноль, а активная приближается к волновому сопротивлению окружающей воздушной среды. Эта зависимость также вносит свой вклад в общую частотную характеристику уха, увеличивая чувствительность на средних частотах на 13 дБ по отношению к краям диапазона.

Миниатюрные косточки рычага в среднем ухе прикреплены к жёсткой стенке эластичными иннервированными связками, и с этим связаны ещё две функции среднего уха. Во-первых, при высокой интенсивности звука связки изменяют свою длину так, что коэффициент передачи рычага уменьшается. Такую функцию в технике называют автоматической регулировкой усиления (АРУ), это расширяет динамический диапазон уха в сторону высокого звукового давления и отодвигает порог разрушения барабанной перепонки. Во вторых, строение этих эластичных связок защищает овальное окно канала передачи звукового сигнала от костного звука собственного голоса. «Развязка» сигнального канала от этой мощной помехи составляет около 100 дБ.

Наконец, последняя, но не менее важная функция среднего уха обеспечивается евстахиевой трубой. Это длинный и тонкий канал, соединяющий полость среднего уха с носоглоткой. Этот канал является акустическим дросселем, который свободно пропускает низкочастотные и квазистатические перепады давления и выравнивает давления в среднем ухе и в наружной среде. Это защищает барабанную перепонку от разрушения из-за сравнительно больших изменений наружного давления, связанного с метеословиями или с изменениями положения организма по высоте, и не имеющего отношения к звуковой информации. В тоже время для частот выше 15-20 Гц этот импеданс этого «дросселя» возрастает и его шунтирующее действие уже не препятствует колебаниям барабанной перепонки. Нарушение этой функции становится заметным при простудных и инфекционных заболеваниях носоглотки, когда её набухшие ткани пережимают евстахиеву трубу, и это сопровождается болезненными ощущениями при резких изменениях атмосферного давления.

Овальное окно, воспринимающее колебания от среднего уха является входом в улитку, служащую основным элементом внутреннего уха. Именно здесь происходит преобразование акустических колебаний в электрический сигнал, передаваемый по слуховым нервам в мозг. Принцип строения внутреннего уха виден на рис. 5.4.25, где показан попереч-

ный разрез улитки. Сама «улитка» представляет собой коническую трубку, свёрнутую в два с половиной оборота, как натуральная улитка. В её широкой части

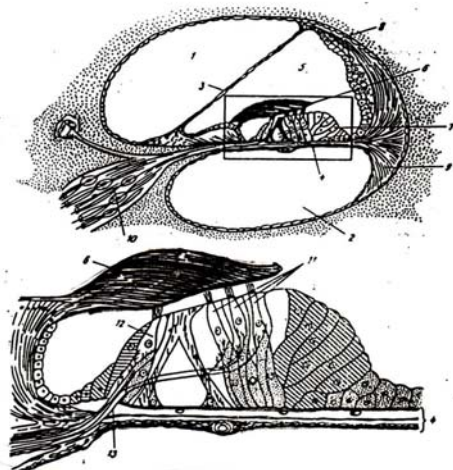


Рис. 5.4.25. Верхняя часть рисунка – поперечное сечение улиткового хода. Нижняя часть – увеличенное изображение механочувствительной системы улитки, отмеченной прямоугольной рамкой на верхней части рисунка. 1 – канал преддверия, 2 – барабанный канал, 3 – вестибулярная мембрана, 4 – базальная мембрана, 5 – улитковый ход, 6 – покровная мембрана, 7 – кортиев орган, 8 – секреторный эпителий, 9 – спиральная связка, 10 – спиральный ганглий, 11 – наружные волосковые клетки, 12 – внутренние волосковые клетки, 13 – нервные волокна слухового нерва.

находятся два окна (овальное и круглое), отделённые от пространства среднего уха мембранами. На мембране овального окна находится стремячко. По средней плоскости улитковой трубки расположена перегородка, разделяющая внутренний объём улитки на две части, которые соединяются между собой через небольшое отверстие («геликотрему») лишь в дальней узкой части трубки. Круглое окно закрыто герметичной, но эластичной мембраной. Наличие такой мембраны увеличивает амплитуду колебаний лимфы в улитке (лимфа несжимаемая жидкость) и снижает входной импеданс улитки. Перегородка, как это видно из рисунка, имеет сложное строение, но её роль проста: воспринимать колебания, возбуждаемые в улитке вибрацией овального окна. В состав перегородки входит

сравнительно жёсткая базальная мембрана, на которой находятся механорецепторы, и тонкая вестибулярная мембрана, отделяющая звуковоспринимающую систему от лимфы, заполняющей остальной объём улитки. Мягкий и подвижный язычок покровной мембраны, вибрирующий при возбуждении улитки через овальное окно, лежит на волосках механорецепторных клеток и деформируя их, изменяет электрический потенциал клеток, анализируемый через слуховой нерв высшими отделами нервной системы. Казалось бы, этого достаточно, чтобы дешифровать амплитуду и частоту звуковых колебаний. Но не всё так просто. Непосредственное возбуждение слухового нерва пациента электрическим током звуковой частоты в экспериментах не создаёт ощущения чистого тона, а порождает лишь образ «белого» шума. Вероятно, распознавание звука определяется не столько частотой возбуждения рецепторных клеток, сколько положением возбуждаемых клеток на разделяющей перегородке улитки.

История изучения механизма дешифровки звука в улитке состоит из анализа нескольких гипотез. Одна из них принадлежала Дж. Рэлею и получила название мембранной (или телефонной). Гипотеза основывалась на аналогии свойств разделяющей перегородки с телефонной мембраной: при звуковом возбуждении перегородки она приходит в колебательное движение и возбуждает волосковые клетки на частоте поступающего звука. Будучи прозрачной с точки зрения физики, она привлекла заслуженное внимание исследователей на первом этапе изучения слухового аппарата. Действительно, если убрать вестибулярную мембрану и освободить базальную мембрану от кортиева органа, то оставшийся препарат ведёт себя как тонкая упругая мембрана. Однако от гипотезы Рэлея пришлось отказаться, когда стало известно, что слуховой нерв не способен передавать электрические колебания в звуковом диапазоне. На смену ей пришла «резонансная» гипотеза Г. Гельмгольца. Она использовала то обстоятельство, в разделяющей перегородке иногда можно наблюдать некую поперечную структуру типа струн. Длина и толщина струн изменялась вдоль перегородки при продвижении по ней от входа вглубь улитки. Представлялось, что эти образования являются струнами, резонирующими на своих частотах и локализующими возбуждение в некотором участке разделяющей мембраны улитки. И действительно, наблюдения над пациентами, имевшими профессиональные дефекты слуха (например, рабочие на лесопилке, много лет подвергавшиеся «визгу» пилы на одной частоте), показали, что у них разрушен определённый участок базальной мембраны, по-видимому ответственный за восприятие этой частоты. Однако эта гипотеза не получила количественного совпадения с теоретическими ожиданиями. Резонансная частота f_0 натянутой струны длиной L , как известно, определяется формулой:

$$f_0 = (T/\rho)^{1/2}/2L, \quad (5.4.20)$$

где T – натяжение нити, ρ – её погонная плотность. Вариация величин параметров, входящих в эту формулу, в пределах базальной мембраны, совершенно недостаточна для того, чтобы обеспечить вариацию резонансной частоты в пределах всего частотного диапазона слухового аппарата.

Важный этап исследования возможных механизмов дешифровки частоты звука, попадающего в улитку, был выполнен венгерским биофизиком фон Бекеша. Он рассмотрел как равноправные четыре гипотезы: 1 – мембранную Рэлея, 2 – резонансную Гельмгольца, 3 – гипотезу стоячих волн возбуждения базальной мембраны с пространственными гармониками деформации мембраны и 4 – гипотезу бегущих по мембране волн пространственных гармоник деформации. Каждый из этих режимов возбуждения мембраны требует определённого характера распределения жёсткости по мембране и сопровождается определённым распределением фаз колебаний при гармоническом возбуждении мембраны. В частности, вид деформации мембраны на точечное статическое воздействие, характерный для возможности каждого из этих режимов, приведен на рис. 5.4.26.

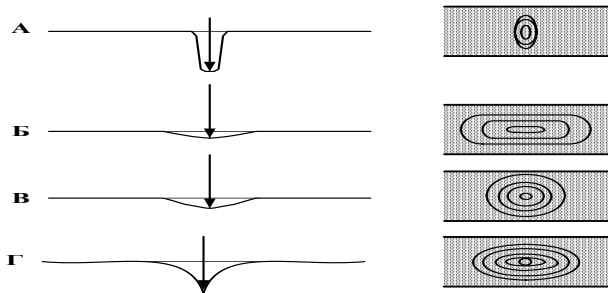


Рис. 5.4.26. Эпюры деформаций мембраны, способной к возбуждению режиме Рэлея (А), Гельмгольца (Б), в режиме бегущих волн (В), в режиме стоячих волн (Г).

Распределение фаз колебаний участков мембраны при монохроматическом возбуждении улитки показан на рис 5.4.27.

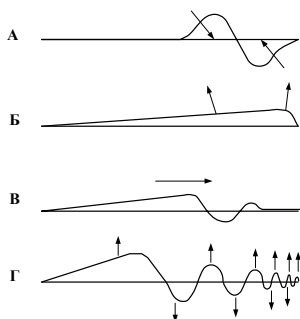


Рис. 5.4.27. Распределение фаз деформаций мембраны, характерное для режима Рэлея (А), Гельмгольца (Б), режима бегущих волн (В) и режима стоячих волн (Г).

В необычайно тонких и изящных измерениях, проведенных Бекеша на препаратах из трупов погибших во время войны он однозначно сделал выбор в пользу гипотезы бегущих волн. Пример распределения деформации по оси базальной мембраны вдоль координаты от входа в улитку к её вершине в два близких момента времени показан на рис 5.4.28.

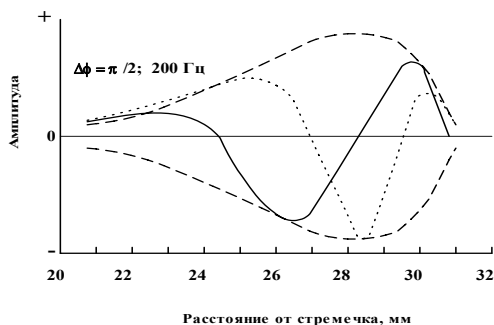


Рис. 5.4.28. Распределение магнитуд деформаций базальной мембраны по глубине проникновения в улитку на частоте колебаний 200 Гц. для улитки слона.

При этом волны деформации бегут по мембране в пределах некоторой огибающей, показанной на рис.5.4.28 пунктиром. Положение максимума огибающей по пространственной координате вдоль базальной мембраны зависит от частоты возбуждения: с ростом частоты возбуждения максимум ближе прижимается ко входу в улитку. Кривая зависимости положе-

ния максимума огибающей бегущей волны образует дешифровочную зависимость. Пример такой кривой для уха слона приведен на рис. 5.4.29.

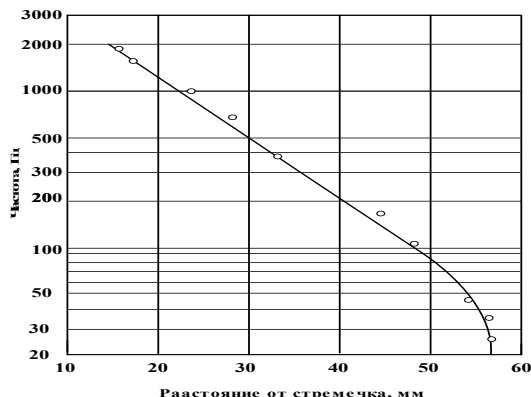


Рис. 5.4.29. Дешифровочная кривая для уха слона. По горизонтальной оси координата положения максимума огибающей бегущей волны, отсчитанная от входа в улитку. По вертикали – частота звука.

Гипотеза фон Бекеша значительно лучше, чем другие согласуется с экспериментальными данными. Однако у неё есть одно слабое место. Максимум огибающей осцилляций деформации мембраны в бегущей волне, показанный на рис. 5.4.28, весьма пологий, и его положение не может быть определено простыми физическими средствами с точностью, необходимой для высокой частотной селективности, свойственной уху человека (1 Гц в районе частоты около 1 кГц.). Фон Бекеша блестяще решил эту проблему. В остроумном эксперименте он показал, что механизм латерального взаимного торможения в ансамбле механорецепторов (подобный тому, который используется для контрастирования изображения на сетчатке глаза, рис. 5.4.18.) приводит к резкому обострению огибающей кривой на рис. 5.4.28 в районе максимума при регистрации её нейрофизиологическими механизмами слухового аппарата.

Совокупное действие всех трёх отделов слухового аппарата с их частотными и амплитудными характеристиками формируют общую характеристику уха. Её принято изображать в виде семейства кривых равной слышимости, т. е. зависимости уровня звукового сигнала, обеспечивающего заданную слышимость на всех частотах звукового диапазона. Такая характеристика для человека приведена на рис. 5.4.30.

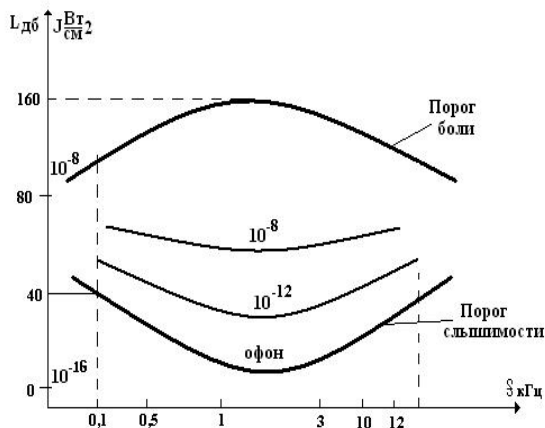


Рис. 5.4.30. Кривые равной слышимости для уха человека.

Самый низкий порог слышимости приходится на средние частоты диапазона. Именно там складываются резонансные усилия всех разделов слухового аппарата, обеспечивая уникально высокую чувствительность. На этот же диапазон приходится и наибольшие усилия по защите слухового аппарата от разрушения. Эволюция приспособила максимальные возможности слуха человека к диапазону 1 – 3 кГц, как наиболее информативному для анализа ситуации в окружающем мире.

5.5. Элементы радиационной биофизики.

С тех пор как в конце 19 века была открыта радиоактивность, она сразу стала важным предметом физической науки. Вскоре обнаруженная биологическая агрессивность ионизирующей радиации привлекла пристальное внимание медико-биологического сообщества. Научные, методические и технические проблемы биологической активности ионизирующей радиации составили значительную часть тогдашней биофизики. Бурное развитие радиоизотопной технологии в науке, промышленности и медицине, строительство научных и промышленных реакторов, испытания и использование атомного оружия многократно усилили актуальность проблемы радиационного воздействия на живые системы и сделали радиационную биофизику особенно востребованной. На какое-то время она стала главной частью биофизической науки. Понятия и

достижения радиационной физики естественным образом встроились в аппарат биофизики и обусловили её быстрый прогресс в этой области.

5.5.1. Основные характеристики излучения и его биологической активности.

Полагая, что читатели достаточно знакомы с основами атомной и ядерной физики, вспомним лишь необходимые основные понятия и единицы измерений.

Гамма-излучение –излучение, сопровождающее многие ядерные процессы и превращения элементарных частиц. Популярными источниками его являются изотопы ^{60}Co и ^{137}Cs . Это электромагнитное излучение высокой энергии, которое обладает большой проникающей способностью, изменяющейся в широких пределах, и может повредить кожу и внутренние ткани. Плотные материалы (свинец, бетон) являются отличными барьерами на пути γ -лучей.

Рентгеновское излучение – это аналог γ -излучения, испускаемого ядрами, но получаемое от рентгеновской трубки и потому легко управляемое.

Синхротронное излучение - это электромагнитное излучение ускоренных релятивистских электронов. Имеет непрерывный энергетический спектр от жёсткого УФ до рентгеновского излучения. Обладает высокой биологической эффективностью.

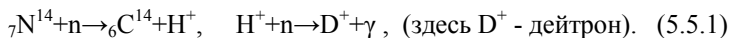
Бета-излучение - это быстрые электроны (или позитроны), являющиеся продуктом спонтанных ядерных реакций, вторичным продуктом распада атомов - мишеней ионизирующей радиации или ускоренные в электронных ускорителях. Они могут проникать в ткани организма через кожу на один-два сантиметра. Излучение может быть задержано листом металла, оконным стеклом, обычной одеждой. Бета-излучение поражает незащищенную кожу и глаза. При попадании источника β -излучения внутрь организма спектр неприятностей значительно расширяется. Для экспериментальных целей в качестве источников чистого β -излучения применяются ^{32}P , ^{14}C , ^{90}Sr и др.

Протонное излучение - поток протонов, возникающих в ядерных реакциях, но чаще приходящих из космоса или получаемых в специальных ускорителях. В ближнем космическом поясе Земли (600-1000 км) протоны представляют основную опасность для пилотируемой космонавтики. Длина пробега протонов в среде сильно зависит от их энергии. В воздухе у поверхности Земли это величина от метров до нескольких км, в более плотной живой ткани это десятки и сотни мкм.

Альфа-излучение представляет собой поток положительно заряженных ядер гелия ($2p, 2n$), испускаемых атомами таких тяжелых элементов, как уран, радий, радон, полоний и плутоний. Длина пробега α -частиц в воздухе составляет несколько сантиметров, в воде - до 150 мкм. Оно полностью задерживается листом бумаги или эпидермисом кожи. Поэтому оно не представляет опасности до тех пор, пока источники α -излучения не попадут внутрь организма через открытую рану, с пищей или вдыхаемым воздухом; тогда они становятся чрезвычайно опасными.

Многозарядные частицы – это ионы, как продукты действия первичной ионизирующей радиации или специально создаваемые и ускоряемые в ускорителях. Высокоэнергичные частицы – самый агрессивный вид ионизирующего излучения.

Нейтронное излучение обладает высокой проникающей способностью, поэтому опасно для всех органов, но наиболее чувствительным к нейтронному излучению является хрусталик глаза. Нейтроны могут быть остановлены только толстым бетонным, водяным или парафиновым барьером. Основным источником нейтронов являются ядерные реакторы. Медленные (с энергией < 10 Кэв) и «тепловые» (с энергией 0,025 эв) нейтроны не выбивают протоны, а захватываются ядрами атомов среды и вызывают сильно ионизирующее γ -излучение и выход протонов. При этом для живой ткани характерны процессы типа:



Радиоактивность вещества, т. е. интенсивность потока ионизирующей радиации из источника, характеризуется частотой распада радионуклидов в источнике. Единицей активности является «**Беккерель**» (**Бк**): это 1 распад в секунду. Более практичная единица – «**Кюри**» (**Ки**): $1 \text{ Ки} = 3,7 \cdot 10^{10} \text{ Бк}$. Так определённая величина радиоактивности не зависит от типа и энергии вылетающих частиц. Более содержательными характеристиками ионизирующей способности источника радиации являются экспозиционная доза и экспозиционная мощность дозы.

Экспозиционная доза ($D_{\text{эксп.}}$) характеризует источник по его способности производить ионизацию объекта воздействия и измеряется числом ионов, рождённым в некоем стандартном объекте за время экспозиции. За единицу экспозиционной дозы принят **Рентген**: это доза γ - или рентгеновской радиации, которая в 1 см^3 сухого воздуха при 0°C и давлении 760 мм. рт. ст. вызывает образование ионов с зарядом (каждого знака) в 1 единицу **СГСЕ**. Так как величина заряда одного иона известна ($4,8 \cdot 10^{-10} \text{ СГСЕ}$), а средняя энергия, требуемая для однократной ионизации молекулы воздуха это - 34 эв, то, зная плотность воздуха при этих условиях, нетрудно рассчитать энергию, поглощённую в 1 грамме воз-

духа: это 84 эрг. В системе СИ аналогом рентгена является единица, не имеющая собственного имени: **1 Кулон/кг** массы воздуха. При этом $1P = 2,58 \cdot 10^{-4} \text{ Кл/кг}$. Для характеристики источника корпускулярного излучения используется понятие физического эквивалента рентгена – **ФЭР**. Это такая доза корпускулярного излучения, которая создаёт в воздухе такую же плотность ионизации, как и γ -излучение.

«Мощность» экспозиционной дозы называют скорость накопления этой дозы:

$$P_{\text{эсп.}} = dD_{\text{эсп.}}/dt \quad (5.5.2)$$

Исторически сложилось так, что она имеет размерность плотности заряда на единицу массы воздуха в единицу времени.

В отличие от экспозиционной дозы, характеризующей потенцию источника излучения, поглощённая доза более непосредственно связана с эффективностью воздействия источника на объект.

Поглощённая доза ($D_{\text{пол.}}$) это – энергия, затраченная на ионизацию единицы массы объекта воздействия. Её единицы это внесистемная единица – **рад** = 100 эрг/грамм массы объекта, а в системе СИ: **Грей** = 1 Дж/кг. Очевидно, $1 \text{ Гр} = 100 \text{ рад}$. Следует заметить, что величина рентгена, выраженная в энергетических единицах (84 эрг/г), численно почти совпадает с величиной рада (100 эрг/г), поэтому их иногда отождествляют. Но это принципиально разные характеристики: первая относится к активности излучателя, а вторая к состоянию объекта его воздействия. Мощность поглощённой дозы, соответственно, это – мощность, затрачиваемая на ионизацию единицы массы объекта воздействия:

$$P_{\text{пол.}} = dD_{\text{пол.}}/dt \quad (5.5.3)$$

Её размерность в СИ: Вт/кг .

Поглощённая доза коррелирует с повреждениями, вызванными ионизирующей радиацией в биологическом объекте, однако, однозначного соответствия между ними нет. Биологический эффект при данной поглощённой дозе зависит от вида излучения и его мощности. Реакции, следующие непосредственно за актами ионизации и возбуждения молекул облучаемой среды, зависят от плотности пространственного распределения этих первичных процессов. В свою очередь линейная плотность ионизации (ЛПИ) и связанная с ней линейная потеря энергии (ЛПЭ), описываемая известной формулой Бете – Блоха, является сложной зависимостью от многих параметров движущейся заряженной частицы. Сравнивать между собой эффективность ионизации в разных случаях можно лишь «при прочих равных условиях», что реально не вы-

полнимо. Кроме того, степень повреждения живого объекта зависит от режима накопления дозы: непрерывное и дробное облучение дают разные результаты. Поэтому практически для такого сравнения предпочитают пользоваться эмпирическими коэффициентами. Так, для учёта «качества» ионизирующей радиации используется шкала коэффициентов относительной биологической эффективности (ОБЭ), отражающей разницу в поражающей способности разных видов излучения (Таблица 5.5.1).

Таблица 5.5.1.

Виды излучения	Относительная биологическая эффективность (ОБЭ)
Рентгеновские и γ -лучи до 3 Мэв	1
β -лучи до 3 Мэв	1
α -лучи	10-20
Протоны и дейтроны (0,5-10 Мэв)	10
Медленные нейтроны	3
Быстрые нейтроны до 20 Мэв	10
Тяжёлые ионы	20

При всей приближённости и условности этих коэффициентов можно видеть, что, например, тяжёлые частицы при той же плотности поглощённой энергии могут быть в десятки раз более агрессивны по отношению к биологическому материалу, чем γ -лучи. Биологически эквивалентная доза (БЭД) для них значительно больше, чем для γ -излучения:

$$\text{БЭД} = \text{ОБЭ} D_{\text{полг}}$$

Единицей измерения БЭД в СИ является *Зиверт* (Дж/кг). Величина БЭД служит основной величиной для усреднённой оценки общей радиационной опасности.

Биологический эффект поглощённого излучения зависит также от локализации первичного поражения в организме. Так, если принять эффективность поражения организма при равномерном распределении поглощённой дозы по всему объёму тела человека за единицу, то эквивалентная доза, поглощённая в отдельной ткани или органе, может сильно отличаться по своей эффективности от 1. Это определяется с одной стороны различной радио чувствительностью тканей и их важностью для жизни организма, а с другой стороны состоянием живого организма в целом и его способностью противостоять поражению отдель-

ных его частей. Некоторые коэффициенты эффективности дозы 10 Гр для мышей приведены в Таблице 5.5.2.

Таблица 5.5.2.

Орган или ткань	Коэффициент эффективности, КЭ.
Организм в целом	1
Мышцы	0,3
Семенники или яичники	0,25
Щитовидная железа	0,03
Лёгкие	0,12
Молочная железа	0,15
Костная ткань	0,03
Красный костный мозг	0,12
Печень	0,67
Кишечник	0,73

При данной дозе коэффициент эффективности (его иногда называют ещё коэффициентом риска) равный 1 соответствует крайне тяжёлой степени поражения. В итоге эффективная доза определяется из поглощённой как:

$$D_{\text{эфф.}} = \text{КЭ ОБЭ } D_{\text{полг.}} \text{ (Зиверт)}.$$

Именно эффективная доза служит мерой опасности для живого объекта при оценке вероятности радиационного поражения в конкретной ситуации.

5.5.2. Естественные источники радиации

В противоположность общественному мнению около 90 % радиационного излучения исходит из естественных источников космического и земного происхождения (его называют *фоновым* облучением), и лишь малая часть непосредственно связана с атомной промышленностью и атомным оружием. Человек подвергается облучению естественными источниками радиации двумя способами. При *внешнем* облучении радиоактивные вещества (радионуклиды) находятся вне организма и облучают его снаружи. При *внутреннем* облучении источники находятся внутри организма, куда они попадают с пищей, водой и воздухом.

Средние *годовые* эффективные эквивалентные дозы облучения от естественных источников радиации составляют следующие величины:

1. Космические лучи - 0,28 мЗв;
2. Земные источники - 0,32 мЗв
3. Внутреннее облучение (в основном K^{40}) – 0,15-0,3 мЗв.
4. Родон (в основном через лёгкте) – 0,3 мЗв.

В среднем это – 1,1 мЗв. для лёгких и около 0,75 для гонад. В качестве средней оценки можно считать, что суммарная мощность естественной дозы облучения человека составляет 1 мЗв/год, это соответствует 11 мкРад/час. Сюда следует добавить также и дозы, получаемые пациентами при медицинских процедурах, которые в среднем оцениваются как 0,4 мЗв/год. Однако, на Земле имеются области, где уровень радиации от земных источников в сотни раз превосходит средний (до 260 мЗв в год в некоторых районах Бразилии, расположенных на почвах, богатых торием). Интенсивность космических лучей также неравномерно распределена по земной поверхности. Из-за магнитного поля Земли плотность потока заряженных частиц в приполярных районах значительно больше, чем на экваторе. Это особенно заметно на больших высотах, где эта разница достигает порядка величин и требует учёта при планировании космических полётов. Трансатлантические авиационные перелёты также вносят свой вклад в суммарную дозу получаемой радиации. Так, например, при перелёте из Москвы в США на дозвуковом турбореактивном самолёте пассажир получает дополнительно около 80 мкЗв.

Проблема оценки степени опасности и нормирования дозы ионизирующей радиации является сложной биологической и социально-экономической проблемой, не имеющей пока общепринятого решения. Это особенно относится к малым дозам. Однако в последнее время всё большее число исследователей приходят к выводу, что в области малых мощностей дозы можно выделить **пороговое значение**, ниже которого воздействие ионизирующей радиации практически не имеет заметных патологических последствий. Во всяком случае, эти последствия не успевают проявиться на протяжении жизни на фоне патологий другого происхождения. Более того, есть наблюдения, показывающие, что облучение в подпороговой дозе повышают реактивность организма и его сопротивляемость другим патологическим факторам и является необходимым для жизни экологическим фактором. Разумеется, подобные опыты на людях невозможны, а на животных очень дороги, поэтому указанные выводы были сделаны в основном в эпидемиологических наблюдениях над людьми, подвергшихся облучению при атомной бом-

бардировке в Хиросиме и Нагасаки в 1945 году, а также при аварии на Чернобыльской атомной электростанции в 1986 г.

По мере изучения проблемы и накопления радиобиологических знаний нормы допустимых доз были снижены с 600 мЗв/год (1946 г.) до 20 мЗв. для персонала, профессионально связанного с источниками ионизирующего излучения, и до 1 мЗв/год для остального населения (1996 г.). Реально острое облучение взрослого человека в дозе 0,25 Зв. не приводит к заметным клиническим изменениям в организме. При облучении в дозе 0,5-0,7 Зв. наблюдаются незначительные изменения клеточного состава крови и другие, скоро проходящие изменения в метаболизме и иммунитете, которые можно связать с облучением. Пороговой дозой, вызывающей острую лучевую болезнь принято считать 1 Зв. Лёгкая, средняя и тяжёлая степени этой болезни возникают при дозах, соответственно, 1-2, 2-4, 4-6 Зв. Нижней границей достоверного повышения риска смерти от рака взрослых людей является доза 0,2 Зв. Но у детей до 15 лет отмечается возрастание выхода раков уже при дозе 5-20 мЗв.

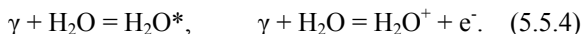
5.5.3. Первичные реакции поражения живой ткани

Как уже упоминалось выше, средняя энергия, затраченная на образование одной пары ионов в воздухе, составляет 34 эв, что почти втрое превышает потенциал ионизации молекул среды. Это означает, что не каждый акт поглощения энергии излучения приводит к ионизации «мишени». Действительно, детальное изучение первичных процессов, возникающих в воде и водных растворах под действием ионизирующего излучения, показало, что на каждый акт образования ионных пар приходится 2-3 случая образования возбуждённых молекул. Некоторый процент этих молекул оказывается в состоянии сверх возбуждения, когда энергия возбуждения превышает потенциал ионизации, и в дальнейшем часть из них может всё же ионизоваться. Остальные же, пребывая некоторое время в возбуждённом состоянии и имея повышенный химический потенциал, могут участвовать в химических реакциях, на которые они не способны в нормальном состоянии. Это могут быть процессы внутренней конверсии с изменением мультиплетности спинового состояния, перенос энергии или заряда на другие молекулы с образованием ионов, свободных радикалов или долгоживущих возбуждённых состояний биомакромолекул. При этом энергия может оказаться на тех степенях свободы макромолекул, которые непосредственно реализуют специфические реакции или регулируют их активность. Если ещё учесть большое разнообразие ионов, которые могут возникать при прямой ионизации даже ограниченного типа молекул, то легко представить,

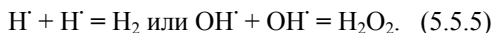
какое огромное множество процессов в среде может породить радиация. Специфика живой ткани состоит, прежде всего, в наличии в ней значительной фракции воды. Поэтому естественно разделить реакции биологического материала, индуцированные радиацией, на два класса: *косвенное* воздействие продуктов радиолиза воды на биомолекулы и *прямое* воздействие радиации на биомолекулы. Как показывают эксперименты, косвенное действие вносит очень существенный вклад: радиационное повреждение биомолекул возрастает в сотни раз, если в препарате присутствует вода. Рассмотрим кратко оба механизма воздействия.

5.5.3.1. Радиолиз воды.

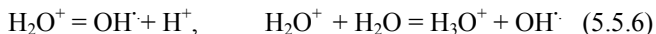
Основные первичные реакции *сверх* возбуждения и ионизации, индуцированные в воде гамма излучением:



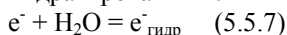
Сверх возбуждение молекулы воды может соответствовать её избыточной энергии примерно до 30 эВ. Релаксация этого состояния может приводить к распаду молекулы с образованием свободных радикалов (H^\cdot и OH^\cdot) или к её ионизации (потенциал ионизации молекулы воды составляет 12,6 эВ.), давая те же продукты, что и непосредственная ионизация гамма квантом. При диссоциации по первому типу возникшие продукты нестабильны и спонтанно превращаются в другие. Возникающие свободные радикалы пространственно близки и могут вступать в реакции между собой. При этом наряду с воссозданием исходной молекулы H_2O могут возникать и новые продукты



При диссоциации по второму типу электрон, вылетающий из молекулы, оказывается значительно более удалённым от H_2O^+ , и обратная рекомбинация маловероятна. Поэтому из продуктов ионизации воды образуются, как правило, другие соединения:

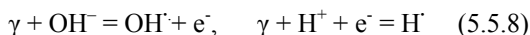


Если в среде, в которой находится освобождённый электрон, нет молекул, способных его акцептировать или принять полностью его энергию и перейти в возбуждённое состояние, то время жизни электрона может превысить время электрической поляризации окружающей среды. Эта ситуация наблюдается в водной среде без примесей, в которой характерное время атомной поляризации порядка фемтосекунд, а ориентационное порядка пикосекунд. При этом электрон оказывается в потенциальной яме, и время его жизни в квазисвободном состоянии значительно возрастает. Такой электрон называют сольватированным, а применительно к водной среде – гидратированным.

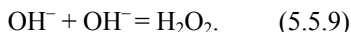


Время жизни $e^-_{\text{гидр}}$ в высокоочищенной воде достигает 1 мс. Коэффициент диффузии его достаточно большой ($4,7 \text{ см}^2 \text{ сек}^{-1}$), и за это время он способен переместиться на значительное расстояние до примесной молекулы и восстановить её. Это сильный восстановитель, его «редокс потенциал» равен -2,58 В. В присутствии в растворе молекулярного кислорода он может образовать ион-радикал кислорода O_2^- . Эта высокоактивная частица играет важную роль в радиационных процессах.

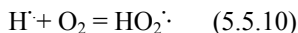
Продукты реакций (5.5.6), в свою очередь, также могут быть мишенями для гамма квантов:



или вступать в реакции между собой:



Правда, эта реакция требует большой энергии активации и в обычных условиях маловероятна. Однако в присутствии кислорода возможны более эффективные пути образования перекиси:



В итоге по указанным и другим схемам могут образовываться свободные радикалы (OH^\cdot , H^\cdot , HO_2^\cdot) и перекиси (H_2O_2 и H_2O_4). Это весьма активные реагенты, способные атаковать органические молекулы, если они присутствуют в среде.

5.5.3.2. Радиоллиз органических молекул.

Если условно обозначить органическое соединение как RH, то возбуждающее или ионизирующее действие гамма квантов можно представить аналогично реакциям (5.5.4):



В присутствии в растворе кислорода по механизму, подобному приведенному в схеме (5.5.10), могут образовываться перекисные радикалы (RO_2^{\cdot}), которые, реагируя с органическим субстратом, могут порождать цепные процессы:



Много перекисей и перекисных свободных радикалов образуется в липидах, нуклеиновых кислотах, пиримидиновых основаниях, которые являются основными объектами радиационного воздействия.

Разумеется, при низких концентрациях макромолекул доминирующим механизмом их радиационного поражения является первый, косвенный. С ростом концентрации биополимеров вклад прямого поражения возрастает, но в реальной биологической ткани вклад косвенного влияния воды остаётся весьма существенным. Поражение биополимеров, отвечающих за хранение и реализацию наследственной информации, за организацию биохимических превращений в клетке, за распределение электрических полей, играющих важную роль в управлении внутриклеточными процессами и в межклеточной коммуникации, приводит к различным патологиям. Их тяжесть зависит от поглощённой дозы и её локализации. Развитие цепных процессов значительно увеличивает скорость и масштаб поражения.

Не останавливаясь на медицинских аспектах лучевого поражения, отметим несколько важных молекулярно биологических и биофизических моментов.

- Биополимерам в нативном состоянии свойственна способность к самозащите. Она основана на способности к миграции энергии и элементарных зарядов по системе внутримолекулярных валентных и водородных связей. Это приводит к тому, что возникшие в полимере атомные возбуждения и электронно – дырочные пары могут перемещаться по всему объёму полимера, пока не рекомбинируют или не достигнут ловушки и не локализуются на ней. Таким образом, в обоих случаях объём макромолекулы оказывается защищённым от поражения, во втором случае – за счёт ловушки – «жертвы». В белках такими ловушками обычно оказываются аминокислотные остатки глицина и серосодержащих аминокислот. Квантовый выход поражения других участков молекулы, в том числе функционально важных, снижается в сотни раз по сравнению с простой смесью всех аминокислот, из которых построен данный белок.
- В процессе эволюции природа выработала эффективные специальные молекулярные и системные механизмы защиты от радиационного поражения. К молекулярным механизмам относятся некоторые репарационные устройства, которые обнаруживают и ликвидируют первичные поражения биологически важных молекул. Их защитные функции распространяются на поражения не только от радиации, но и от других внешних факторов (химических и фотохимических) и случайных ошибок биосинтеза. Системные реакции защиты включают *апоптоз* – целенаправленное уничтожение поражённых макромолекул, органелл, клеток (и организмов!), если их не удаётся восстановить за счёт репарации. Устройство и интересные механизмы действия этих систем являются предметом молекулярной биологии. От их эффективности зависит радиационная устойчивость организма. Вероятно этим в значительной степени объясняется чрезвычайно широкий спектр предельно допустимых уровней радиации у разных организмов при тождественности **первичных** радиационных процессах в любой живой материи. Таблица 5.5.3. иллюстрирует разницу в значениях LD_{50} (доза однократного рентгеновского и гамма излучения, при которой за 30 дней погибает 50% облучённых особей).

Таблица 5.5.3.

Организм	LD ₅₀ в Рентгенах
морская свинка	250
человек	450 - 600
змея	8.000 – 20.000
дрозофила	4.000 (лишь стерилизует)
растения	От 2.000 до 64.000
амёба	700.000
бактерии pseudomonus	10 ⁷ (приостанавливается рост)

- В присутствии в ткани молекулярного кислорода эффект радиационного поражения значительно возрастает. В целом, это явление имеет сложный характер. Но в основе его лежит высокое сродство кислорода к электрону. Захватывая электрон, освобождённый квантом радиации, кислород не только сам становится активной ион-радикальной частицей, но и препятствует рекомбинации электрона с катион радикалом, увеличивая его время жизни и способствуя протеканию новых реакций с его участием. Удаление кислорода из ткани перед облучением заметно повышает её радиационную устойчивость. Отчасти, сенсibiliзирующее действие кислорода можно скомпенсировать введением в клетку соединений с низким редокс потенциалом, т. е. повышающих Ферми уровень электронов во внутриклеточной среде. Такими веществами являются жиры и серосодержащие соединения. Эти представления используются при разработке радиопротекторов.

5.5.4 . Элементы теории мишеней.

В основе количественного анализа радиационных эффектов лежит аппарат «теории мишеней». Эта теория возникла при изучении большого массива экспериментальных результатов типа «доза – эффект» на простых объектах: растворы ферментов, суспензии вирусов, бактерий, клеточных культур и простейших организмов. Теория основана на про-

стых фундаментальных представлениях о характере поражения таких объектов. Кратко эти соображения можно свести к следующим:

- ❑ Квант ионизирующей радиации несёт достаточно большую энергию чтобы поглотившись в атоме вызвать тот или иной эффект первичного поражения.
- ❑ В то же время объёмная плотность потока ионизирующих частиц, вызывающих биологически значимые (а иногда смертельные) эффекты, настолько мала, что «удары» получает лишь небольшая доля объектов атомного масштаба, содержащихся в любом экспериментально используемом объекте облучения.
- ❑ Сами факты попадания квантов в тот или иной точечный объект имеют случайный характер и не зависят друг от друга.
- ❑ По этой причине при любой малой дозе облучения всегда будут отдельные однократно поражённые объекты, а при биологически больших дозах наряду с многократно поражёнными всегда будут оставаться непоражённые объекты.
- ❑ Вероятность подобных дискретных попаданий в элементарный объект при приведенных выше предположениях должна описываться статистикой Пуассона:

$$P(n) = \alpha^n e^{-\alpha} / n!, \quad (5.5.13)$$

где n – число ударов, полученных объектом, α – среднее число попаданий в объект по всему ансамблю подобных объектов.

- ❑ Биологический эффект радиационного воздействия наступает, если некоторая чувствительная область объекта («мишень») испытывает характерное для неё минимальное (или большее) число «ударов».
- ❑ Число ударов, полученное мишенью, должно быть пропорционально поглощённой дозе D (напомним, что доза – это энергия, поглощённая в *единице* массы объекта) и массе мишени. Поскольку масса мишени $m = \mu N_A$, где μ – молекулярная масса мишени, N_A – число Авогадро, а средняя энергия одного «удара» в биологическом материале $\varepsilon = 85$ эВ, то

$$\alpha = mD/\varepsilon = \mu D/N_A \varepsilon. \quad (5.5.14)$$

Приведенные соображения позволяют определить, что вероятность инактивации биологического объекта при k – кратном механизме поражения мишени воздействия равна:

$$P_{\text{пор}}^{(k)} = \sum_n \alpha^n e^{-\alpha} / n! \quad (5.5.15)$$

Здесь суммирование проводится по n от $n = k$ до $n = \infty$. Однако вместо подсчёта суммы бесконечного ряда проще воспользоваться очевидным равенством $P_{\text{пор}} + P_{\text{непор}} = 1$ и ограничиться подсчётом нескольких членов ряда:

$$P_{\text{пор}} = 1 - P_{\text{непор}} = 1 - \sum_n \alpha^n e^{-\alpha} / n!, \quad (5.5.16)$$

Где суммирование проводится по n от $n = 0$ до $n = k - 1$. Для простого, но важного случая «одноударного» механизма поражения мишени ряд в правой части формулы (5.5.16) сводится к одному члену ($n = 0$): $e^{-\alpha}$, для «двухударного» – к двум членам ($n = 0$ и 1): $e^{-\alpha} + \alpha e^{-\alpha}$ и т. д. На рис 5.5.1. показана зависимость доли непоражённых мишеней от поглощённой дозы:

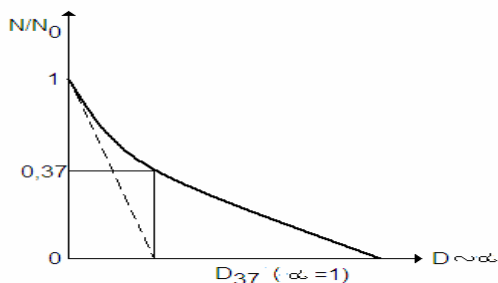


Рис. 5.5.1. Зависимость «выживших» объектов от поглощённой дозы при одноударном механизме поражения.

Значение дозы, при котором доля непоражённых мишеней падает в e раз, т. е. снижается до уровня 0,37 (при этом $\alpha = 1$), получило название «37%- доза выживания» или D_{37} . Одноударный механизм поражения легко верифицируется в радиобиологических экспериментах, т. к. простая экспоненциальная зависимость вероятности выживания от дозы превращается в прямую линию в полулогарифмических координатах: $\ln P_{\text{неп}} = f(D)$. Такой полулогарифмический вид теоретически позволяет определить кратность механизма поражения мишени и при других k . На рис. 5.5.2 показано в таких координатах семейство кривых выживания при различных значениях k . Значение k определяется по значению $P_{\text{неп}}$

в точке пересечения экстраполированной прямолинейной части зависимости $\ln P_{\text{нен}} = f(D)$ с осью ординат.

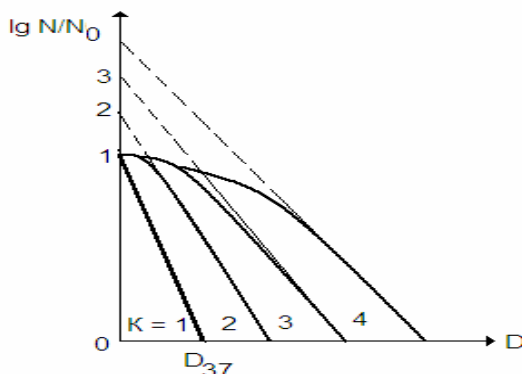


Рис. 5.5.2. Семейство кривых $\ln P_{\text{нен}} = f(D)$ для механизмов поражения различной кратности.

При простых механизмах радиационного поражения (свойственных в свою очередь лишь простым мишеням) использование формул «теории мишеней» позволяет по экспериментальным дозовым кривым получать полезную дополнительную информацию.

Пример 1. В опытах по радиационной инактивации трипсина (молекулярная масса этого фермента 22,4 Да) выяснилось, что это – одноударный процесс и с $D_{37} = 3,6 \cdot 10^7$ рад. Определить среднюю энергию акта ионизации.

Поскольку D_{37} соответствует значению $\alpha = 1$, то из (5.5.14) $\alpha = \mu D_{37} / N_A \varepsilon = 1$. Отсюда $\varepsilon = \mu D_{37} / N_A = 1,35 \cdot 10^{-10}$ эрг = 85 эВ.

Это значение средней энергии одного «удара» характерно для многих элементарных биологических объектов. Принимая его за радиационную константу, можно из подобных расчётов получать значение молекулярной массы для других объектов радиационных экспериментов.

Пример 2. При изучении радиационной устойчивости некоторого фермента выяснилось, что его ферментативная активность подавляется одноударным образом, а сродство к субстрату – двухударным. Каков процент сохранения сродства к субстрату, если фермент облучён дозой, сохранившей 37% его ферментативной активности?

Для сохранения ферментативной активности $P_{\text{непор}} = e^{-\alpha} = e^{-1}$, откуда $\alpha = 1$. Для сохранения сродства к субстрату $P_{\text{непор}} = e^{-\alpha} + \alpha e^{-\alpha} = 0,74$. Итак, сохранится 74% сродства к субстрату.

Практически интересные объекты радиационного воздействия ведут себя более сложным образом. Многие объекты можно рассматривать как составные мишени: для их инактивации необходимо одновременное поражение несколько различных элементарных мишеней. В тех случаях, когда все эти мишени поражаются по k -ударному механизму с равными α , это, очевидно, описывается формулой:

$$^m P_{\text{пор}}^k = (1 - e^{-\alpha \sum_n \alpha / n!})^m, \quad (5.5.17)$$

где m – число элементарных мишеней, а суммирование ведётся по n от $n = 0$ до $n = k - 1$. В более общем случае элементарные мишени, входящие в составную, могут различаться и по своим α , и по кратности своего механизма поражения. Общие формулы получить несложно, но они уже не имеют практического значения: погрешности экспериментальных результатов маскируют различия в теоретических дозовых кривых. Кроме того, в живых объектах, начиная с клетки и более сложных, радиационное воздействие всегда сопровождается развитием патологических и репарационных процессов, которые сильно зависят от условий среды и параметров облучения. Поэтому такие процессы не бывают стационарными и плохо воспроизводятся. Практически для этой области теория мишеней заменяется изучением и использованием эмпирических наблюдений.

6. Заключение.

Заканчивая изложение содержательной части пособия, автор считает необходимым принести читателям свои извинения. Конечно, изложенный материал затрагивает лишь ограниченную часть предмета современной биофизики и играет роль примеров, на которых можно проиллюстрировать физический анализ процессов в живой системе. Да и сами процессы рассмотрены не столь обстоятельно, как это можно было бы сделать при современном состоянии наших знаний. Расширение рассматриваемых процессов и углубление их анализа превратило бы краткое введение в биофизику в объёмный учебник, подобный уже существующим. Задача, которую решал автор, – дать первое упрощённое представление о физических процессах, лежащих в основе функционирования живых клеток и их систем. Ограничен-

ность приведенного материала это восполнимый пробел. Читателям, которым предмет биофизики покажется интересным, данное пособие может помочь в дальнейшем расширить и углубить свои познания на более специализированном этапе своего образования.

Принося извинения, автор имеет в виду более глубокие обстоятельства. Изложение всего материала пособия основано на биофизической парадигме, сформированной в основном в 20 веке. Она состоит в том, что все явления в живой клетке, тканях, органах и организмах сводятся к фундаментальным физическим явлениям типа излучательного и безизлучательного переноса энергии, диффузионного, электродиффузионного и конвективного транспорта вещества (и заряда) и переноса (и преобразования) информации посредством оптических, электрических и химических сигналов, дополненных химическими превращениями вещества. Подобные физико-химические явления хорошо изучены в молекулярной физике и химической термодинамике и кинетике. В конце 20 века стала очевидной необходимость учёта изменения структуры биополимеров, участвующих в переносе энергии и зарядов. Так как это изменяет физические параметры системы (коэффициенты оптического поглощения и преломления, диэлектрическую и магнитную проницаемость и т. п.) и константы скоростей химических реакций, то это превращает систему в «нелинейную». Её анализ не только затруднён в математическом отношении, но и придаёт поведению системы новые интригующие черты. Это специфическое свойство живой материи нашло отражение в новом важном направлении в биофизике: конформационной динамике.

В простейших случаях фундаментальные физические и химические явления проявляются в физико-химических механизмах процессов в живых системах в явном виде. Их анализ при этом не представляет особого труда. В большинстве других случаев – в виде их комбинаций. Анализ их уже представляет собой сложную задачу, требующую использования специфических методов теории систем. Тем не менее большинство исследователей считает, что возникающие трудности носят технологический, вычислительный характер и не ставят под сомнение возможность описания системы с помощью **известных** молекулярно-физических процессов. Автор не вполне разделяет такую уверенность. Новейшие результаты экспериментальных и теоретических исследований свойств живой материи и процессов в живых системах, в том числе малоизвестных широкой научной общественности, а также собственные исследования побуждают предположить, что ближайший отрезок 21 века может стать периодом смены парадигмы биофизики. Высокая чувствительность внутриклеточных процессов к

чрезвычайно слабым внешним физическим и химическим воздействиям, обнаружение неожиданных термодинамических, оптических и электрических свойств водной среды не вписываются в ряд известных физических явлений молекулярной физики. Гипотезы, привлекаемые для объяснения наблюдаемых явлений, носят пока поисковый и зачастую спекулятивный характер. Однако качественный скачок за последние годы в экспериментальных физических и молекулярно биологических методах исследований, освоение пико- и фемтосекундного диапазона и наномасштаба измерений, развитие методов квантовой электродинамики конденсированных сред позволяют надеяться на расширение исследований и быстрый прогресс в этой области. Это позволит более критически и конструктивно подойти к анализу некоторых процессов преобразования энергии и информации в клетке, и, возможно, по иному взглянуть на взаимосвязь структуры внутриклеточной среды и функции её органелл.

Автор не счёл возможным излагать в учебном пособии эти пока дискуссионные материалы исследований, но считает своим долгом предупредить молодого читателя, что к моменту окончания своего биофизического образования и начала самостоятельных исследований некоторые из изложенных в пособии биофизических механизмов могут потребовать не только уточнения, но и пересмотра.

Ниже приводится список доступной для отечественного читателя учебной литературы, в которой можно найти более развёрнутое изложение разделов биофизики, заинтересовавших читателя.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

УЧЕБНИКИ

1. *Костюк П.Г. и др.* Биофизика. — Киев: Выща школа, 1988. 504 стр.
2. *Рубин А.Б.* Биофизика. — М.: Высшая школа, 1904. Т. I, 461 стр., Т. II, 469 стр.
3. *Рубин А.Б.* Лекции по биофизике. — М.: Изд. МГУ, 1995. 160 стр.
4. *Артюхов В.Г., Ковалёва Т.А., Шмелёв В.П.* Биофизика.— Воронеж.: Изд. ВГУ, 1999. 332 стр.
5. *Волькенштейн М.В.* Биофизика. — М.: Наука, 1988. 591 стр.
6. *Волькенштейн М.В.* Общая биофизика. — М.:Наука, 1978. 591 стр.
7. *Волькенштейн М.В.* Молекулярная биофизика. — М.: Наука, 1975. 616 стр.
8. *Владимиров Ю.А. и др.* Биофизика. — М.: Медицина, 1983. 272 стр.
9. *Ремизов А.Н. и др.* Медицинская и биологическая физика. — М.: «Дрофа», 2003. 559 стр.
10. *Тарусов Б.Н. и др.* Биофизика. — М.: Высшая школа, 1968. 467 стр.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Блюменфельд Л.А.* Проблемы биологической физики. — М.:Наука, 1974. 335 стр.
2. *Блюменфельд Л.А.* Решаемые и нерешаемые проблемы биологической физики. — М: УРСС, 2002. 158 стр.
3. *Стэйси Р. и др.* Основы биологической и медицинской физики. — М. ИЛ, 1959. 607 стр.
4. *Бауэр Э.* Теоретическая биология, - Москва – Ижевск: НИЦ «Регуляция и хаотическая динамика»», 2001. 280 стр.
5. *Пригожин И.* Введение в термодинамику необратимых процессов. — М.: ИЛ, 1960. 127 стр.
6. *Романовский Ю.М., Степанова Н.В., Чернавский Д.С.* Математическое моделирование в биофизике. — М.: Наука, 1976.

343 стр.

7. Скулачёв В.П. Энергетика биологических мембран — М.: Наука, 1989. 365 стр.
8. Скулачёв В.П. Рассказы о биоэнергетике. — М: «Молодая гвардия», 1982 191 стр.
9. Кудряшов Ю.Б., Беренфельд Б.С. Основы радиационной биофизики. — М.: Изд. МГУ, 1982. 302 стр.
10. Чернавский Д.С., Чернавская Н.М. Белок–машина. — М.: Янус, 1999. 256 стр.
11. Жорина Л.В., Змиевский Г.Н. Основы взаимодействия физических полей с биологическими объектами. М. МГТУ им. Н.Э. Баумана. 2006. 235 стр.
12. Петров Э.Г. Физика переноса зарядов в биосистемах. — Киев: Наукова думка, 1984 368 стр.

Учебное издание

ТРУХАН Эдуард Михайлович

ВВЕДЕНИЕ В БИОФИЗИКУ

Редактор *И.А. Волкова*
Корректор *О.П. Котова*

Подписано в печать 00.00.2008. Формат 60 × 84 ¹/₁₆. Бумага офсетная.
Печать офсетная. Усл. печ. л.00,25. Уч.- изд. л.00,0. Тираж 300 экз. Заказ №

Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
Московский физико-технический институт
(государственный университет)
Отдел автоматизированных издательских систем “ФИЗТЕХ-ПОЛИГРАФ”
141700, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



Э.М. Трухан

ВВЕДЕНИЕ В БИОФИЗИКУ

2008